

R. 8265

T-477

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 236 número 31 del libro
correspondiente.

Sevilla, 20 JUL 1980

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvira Laffitte



CLONACION Y CARACTERIZACION DE LOS GENES DE LA NODULACION DE
Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CIAT899

Memoria que presenta la Lda.
en Farmacia Carmen Vargas
Macias, para aspirar al gra-
do de Doctor en Farmacia por
la Universidad de Sevilla.

[Handwritten signature]

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 VARGAS MACIAS para optar al grado de Doctor.

El Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Megías', enclosed within a large, irregular oval scribble. A horizontal line is drawn across the bottom of the signature.

Fdo: Manuel Megías Guijo



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MANUEL MEGIA GUIJO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE
LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICO: Que la Tesis Doctoral titulada: "Clonación y
caracterización de los genes de la nodulación
de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli CIAT899",
presentada por la Lda. en Farmacia CARMEN VARGAS
MACIAS para optar al grado de Doctor, ha sido rea-
lizada en este Departamento bajo mi dirección,
reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, expido y firmo el presente
certificado en Sevilla, a 19 de Julio de 1990.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Megias", is written over a large, circular, scribbled-out area.

Fdo: Manuel Megías Guijo

INDICE

	Pag.
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- La fijación biológica de nitrógeno	2
2.- Taxonomía	4
3.- Etapas de la nodulación	10
4.- Estrategias y métodos genéticos utilizados para el análisis de los genes bacterianos que intervienen en la simbiosis	20
4.1.- Identificación de los genes simbióticos ..	20
4.1.1.- Experimentos de transferencia de material genético	20
4.1.2.- Eliminación de material genético	23
4.1.3.- Mutagénesis al azar	24
4.2.- Clonación de genes simbióticos	25
4.2.1.- Plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP-1	25
4.2.2.- Plásmidos del grupo de incompatibilidad IncQ	29
4.2.3.- Estrategias de clonación	30
- Complementación	30
- Hibridación "in situ"	31
4.3.- Caracterización de genes simbióticos	32
5.- Genes simbióticos bacterianos	36
5.1.- Genes de movilidad y quimiotaxis (<u>fla</u> , <u>che</u>)	38
5.2.- Genes tempranos de la nodulación (<u>nod</u>) ...	39
5.3.- Genes implicados en la formación del cordón de infección y en el desarrollo del nódulo	40
5.3.1.- Genes <u>exo</u>	40
5.3.2.- Genes <u>lps</u>	41

5.3.3.- Genes <u>ndv</u>	42
5.4.- Genes requeridos para la fijación de nitrógeno en el nódulo maduro	45
5.4.1.- Genes de fijación de nitrógeno (<u>nif</u> , <u>fix</u>)	45
5.4.2.- Genes para el metabolismo de los bacteroides (<u>dtc</u> , <u>hem</u> , <u>hup</u>)	47
6.- Localización de los genes simbióticos, los plásmidos Sym	50
7.- Genes tempranos de la nodulación (genes <u>nod</u>)	55
7.1.- Genes <u>nod</u> conocidos, estructura de los operones <u>nod</u> , proteínas Nod	56
7.1.1.- Genes <u>nod</u> "comunes"	56
- Genes <u>nodABC</u>	56
- Genes <u>nodIJ</u>	61
7.1.2.- Genes <u>nod</u> "específicos"	62
- Genes <u>nodFE</u>	62
- Genes <u>nodGH</u>	66
- Genes <u>nodLMN</u>	68
- Genes <u>nodPQ</u>	70
- El gen <u>nodO</u>	71
- El gen <u>nodT</u>	72
- El gen <u>nodX</u>	73
- Genes <u>nodK</u> y <u>nodY</u>	74
7.2.- Regulación de los genes <u>nod</u> , el gen <u>nodD</u>	75
7.2.1.- Antecedentes	75
7.2.2.- Características generales del gen <u>nodD</u>	76
7.2.3.- Los factores exudados por la planta, los flavonoides	78

7.2.4.- El gen <u>nodD</u> contribuye a la especificidad de hospedador	81
7.2.5.- Modelo de regulación de los operones <u>nod</u>	83
7.2.6.- Localización de las regiones responsables de las propiedades del gen <u>nodD</u>	85
II.-OBJETIVO DEL TRABAJO	89
III.- MATERIALES Y METODOS	93
1.- Bacterias y plásmidos	94
2.- Sondas de hibridación	94
3.- Medios y condiciones de cultivo	95
4.- Antimicrobianos y productos químicos añadidos a los medios de cultivo	100
5.- Enzimas e isótopos	101
6.- Ensayos de nodulación	102
7.- Ensayo de efectividad	103
8.- Reaislamiento de bacterias a partir de nódulos	103
9.- Análisis del perfil de plásmidos	104
10.- Electroforesis en geles de agarosa	104
11.- Recuperación de ADN a partir de los geles	105
12.- Extracción y purificación de ADN	105
12.1.- ADN total	105
12.2.- ADN plasmidico	105
12.2.1.- De <u>E. coli</u>	105
12.2.2.- De <u>Rhizobium</u>	106
13.- Preparación y aislamiento de fragmentos de ADN total parcialmente digerido	107
14.- Mecanismos de transferencia de ADN	108
14.1.- Conjugación	108

14.2.- Transformación	109
14.3.- Transducción	110
15.- Marcaje de las sondas de ADN	111
16.- Hibridaciones de ADN	111
16.1.- Preparación de las membranas	112
16.2.- Prehibridación	112
16.3.- Hibridación	112
16.4.- Lavado de las membranas	113
16.5.- Exposición de las membranas	113
IV.- RESULTADOS	114
1.- Clonación de los genes de nodulación de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CIAT899	115
1.1.- Construcción de un banco de genes de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CIAT899 ...	115
1.2.- Análisis de la calidad del banco	116
1.3.- Aislamiento de cósmidos recombinantes portadores de los genes <u>nod</u> de CIAT899 ..	118
1.4.- pCV38, pCV117, pCV61 y pCV65 son cósmidos solapados	119
2.- Análisis de los cósmidos recombinantes	120
2.1.- Ensayo de nodulación	120
2.2.- Hibridación de los cósmidos solapados frente a los genes <u>nod</u> "comunes" de <u>R. meliloti</u>	121
2.3.- Extensión del rango de hospedador de <u>R. meliloti</u> y de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>trifolii</u> por los cósmidos pCV38, pCV117 y pCV61	122
3.- Delimitación de la región <u>nod</u>	124
3.1.- Organización física de pCV38	124
3.2.- Subclonación de los fragmentos de pCV38 y ensayo de complementación	

en plantas de frijol	125
3.3.- Extensión del rango de hospedador de <u>R. meliloti</u> y de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>trifolii</u> por el subclón pCV3804	126
3.4.- Ampliación del mapa físico del subclón pCV3804	127
4.- Organización genética de la región <u>nod</u> de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CIAT899	129
4.1.- Detección de <u>nifH</u>	129
4.2.- Detección de genes <u>nod</u>	131
4.2.1.- Detección de <u>nodAB</u>	131
4.2.2.- Detección de <u>nodC</u>	132
4.2.3.- Detección de <u>nodIJ</u>	133
4.2.4.- Detección de <u>nodD</u>	133
4.2.5.- Detección de <u>nodE</u>	134
5.- Ensayos en otras plantas hospedadoras de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CIAT899	135
5.1.- Hibridación de los ADNs totales de CIAT899 y RSP900, y de los ADNs de pCV38 y pCV3807 frente a la región subclonada en pCV3822	136
5.2.- Ensayos de extensión del rango de hospedador	138
6.- El gen <u>nodD</u> de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CIAT899 como determinante de la especificidad de hospedador	141
7.- Análisis del cósmido pCV61	143
8.- Ensayo preliminar de la funcionalidad del gen <u>nodD</u> de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CIAT899	145
V.- DISCUSION	147
VI.- CONCLUSIONES	164
VII.- BIBLIOGRAFIA	166

I.- INTRODUCCION

1.- LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

Es un hecho conocido que uno de los factores limitantes para el crecimiento de las plantas superiores es la disponibilidad de nitrógeno en el suelo. A pesar de que este elemento constituye las 4/5 partes de la atmósfera terrestre, la capacidad de utilizar directamente este componente esencial de muchas moléculas biológicas está restringida a unos pocos grupos de microorganismos procariotas, que fijan el nitrógeno reduciéndolo a ión amonio. Este proceso, denominado fijación biológica de nitrógeno o diazotrofia, supone en términos agronómicos un enorme beneficio potencial; así, se ha estimado que los microorganismos diazotróficos fijan e incorporan a la biosfera aproximadamente 2×10^8 toneladas de nitrógeno por año (Burns y col., 1975), lo que compensa a nivel global las pérdidas producidas por la desnitrificación.

Numerosas plantas se benefician de este proceso estableciendo algún tipo de asociación con las bacterias fijadoras de nitrógeno, pudiendo variar ésta desde una rizocenosis (asociación más bien casual), hasta las más sofisticadas y efectivas simbiosis intracelulares entre bacterias rizobiáceas y leguminosas, pasando por situaciones intermedias, tales como las asociaciones entre determinadas plantas leñosas y el actinomiceto Frankia, o las establecidas entre una gran variedad de plantas y las cianobacterias Anabaena y Nostoc.

Hace aproximadamente un siglo, Hellriegel y Wilfarth (1888) publicaron un trabajo en el que se describía por pri-

mera vez la observación de fijación biológica de nitrógeno en plantas leguminosas; este hallazgo, que dió explicación al uso tradicional de las leguminosas como abono verde, pudo haber conducido a un incremento en la utilización de tales plantas; sin embargo, el descubrimiento por Haber de los principios de la fijación industrial de nitrógeno y la producción de fertilizantes nitrogenados dió un estímulo tan fuerte al uso de productos comerciales que la aplicación de las leguminosas declinó.

No es sino hasta la década de los 70 cuando diferentes factores van a contribuir a la revalorización de la fijación biológica de nitrógeno, entre ellos cabe citar el continuo incremento en la demanda de nitrógeno en la agricultura, el aumento de los precios de los fertilizantes comerciales durante la crisis del petróleo y algunas fascinantes, aunque a veces exageradas, expectativas basadas en las posibilidades de la genética molecular. Desde entonces, la simbiosis rizo-bio-leguminosa viene siendo objeto de un estudio detallado, no sólo por su evidente importancia económica, sino también porque representa una compleja interacción entre procariotas y eucariotas, que supone tanto la expresión coordinada de genes como la diferenciación celular de ambos organismos.

2.- TAXONOMIA

Inicialmente, las bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico en simbiosis con las leguminosas fueron asignadas a un único género, Rhizobium (familia Rhizobiaceae, tribu Rhizobieae), apareciendo de esta forma en en la primera Lista de Bacterias Aceptadas (ALBN: Approved Lists of Bacterial Names) (Skerman y col., 1989), publicada por primera vez en el International Journal of Systematic Bacteriology el 1 de Enero de 1980, fecha que supuso un nuevo punto de partida para la nomenclatura de bacterias. En esta lista se incluyeron 6 especies descritas dentro del género Rhizobium: R. japonicum, R. leguminosarum, R. lupini, R. meliloti, R. phaseoli y R. trifolii. Esta clasificación, ya histórica, considera el espectro de nodulación como principal criterio taxonómico; así por ejemplo, todos los microsimbiontes aislados de soja se denominaron Rhizobium japonicum, o todos los aislados de Lupinus sp. fueron englobados en la especie Rhizobium lupini.

Posteriormente, el género Rhizobium fue subdividido en dos, Rhizobium y Bradyrhizobium, e incluidos junto con Agrobacterium y Phyllobacterium en la familia Rhizobiaceae (Jordan, 1984). Los miembros de esta familia son bacilos aerobios, Gram negativos, móviles, no esporulados, y que interactúan con determinadas plantas dando lugar a hipertrofias corticales. Así, las especies de Rhizobium y Bradyrhizobium inducen la formación de estructuras especializadas, denominadas nódulos, en las raíces de plantas leguminosas; dentro de

los nódulos, las bacterias se encuentran como bacteroides y reducen el nitrógeno molecular a amonio, que es asimilable por la planta. Mientras que los representantes de Rhizobium poseen un tiempo de generación inferior a 6 horas y acidulan el medio como consecuencia de su crecimiento, las especies de Bradyrhizobium (con anterioridad llamados Rhizobium de crecimiento lento) tienen tiempos de generación mucho mayores y alcalinizan el medio en el que crecen. En la clasificación de Jordan (1984), el género Rhizobium comprende tres especies, R. meliloti, R. loti (de nueva creación, recogida en el suplemento de las ALBN que abarca desde el 1-1-1980 hasta el 1-1-1989) (Moore y Moore, 1989), y R. leguminosarum, a su vez con tres biovariedades: R. leguminosarum bv. viciae, R. leguminosarum bv. trifolii y R. leguminosarum bv. phaseoli, que corresponden a las anteriormente denominadas R. leguminosarum, R. trifolii y R. phaseoli, respectivamente. En cuanto al género Bradyrhizobium, éste se define como un grupo muy heterogéneo, con sólo una especie bien caracterizada, B. japonicum, que corresponde a Rhizobium japonicum de crecimiento lento (recogida ya como B. japonicum en el suplemento de la ALBN hasta el 1-1-1989) (Moore y Moore, 1989). Aunque cabe esperar que como consecuencia de futuros estudios aparezcan nuevas especies o biovariedades, a falta de éstos, la especie R. lupini, llamada así en base a su hospedador habitual, es asignada a Bradyrhizobium sp. (Lupinus). Asimismo, otros Bradyrhizobium se nombran como Bradyrhizobium sp., seguido por el nombre genérico de la planta a la que normalmente infectan

(Jordan y col., 1984).

Los métodos y criterios taxonómicos utilizados en la elaboración de esta clasificación incluyen estudios de taxonomía numérica, contenido de guanina más citosina, homología de ADNs, patrones de proteínas, serología, tipificación de fagos y composición de polisacáridos extracelulares; asimismo considera el espectro de infección, fundamentalmente en la diferenciación de las tres biovariedades de R. leguminosarum, pero sólo como complemento de los otros criterios anteriormente mencionados.

Esto solucionó la confusión creada cuando una estirpe se revelaba capaz de nodular varios hospedadores, tal es el caso de los representantes de Bradyrhizobium, cuyo espectro de nodulación suele ser generalmente amplio (Jordan, 1984); es más, si bien es cierto que la mayoría de las especies de Rhizobium poseen un rango de hospedador limitado, es relativamente frecuente encontrar casos de "infección cruzada", en los que determinadas estirpes de Rhizobium nodulan leguminosas que no son típicamente "las suyas", o incluso cepas de Rhizobium de amplio espectro de hospedador, cuyo caso más extremo descrito es Rhizobium sp. NGR234, que es capaz de establecer simbiosis efectivas con más de 15 especies de leguminosas, o incluso con plantas no leguminosas, como la ulmácea Parasponia andersoni (Lewin y col., 1987; Martínez y col., 1990). Por último, a todo esto hay que añadir la existencia de plantas "promiscuas", la mayoría tropicales, como Vigna o Macroptilium, que son noduladas por una gran variedad

de especies de Rhizobium y Bradyrhizobium (Lewin y col., 1987).

En el suplemento de la Lista de Bacterias Aceptadas (Moore y Moore, 1989) aparecen dos nuevos géneros, escindidos del género Rhizobium: Sinorhizobium, con las especies S. fredii y S. xinjiangensis, y Azorhizobium, con una sola especie, A. caulinodans. Al igual que B. japonicum, Sinorhizobium proviene de la separación de R. japonicum en base a su tiempo de generación; mientras que los de crecimiento lento fueron asignados a B. japonicum, los de crecimiento rápido fueron denominados en principio como Rhizobium fredii (Scholla y Elkan, 1984) y posteriormente como Sinorhizobium (Chen y col., 1988).

El género Azorhizobium (Dreyfus y col., 1988), en otro momento llamado Rhizobium sp. (Sesbania), incluye simbiontes que forman nódulos efectivos tanto en tallos como en raíces del género tropical Sesbania, una leguminosa leñosa. Por otra parte, Azorhizobium es único entre las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis, ya que es capaz de fijar nitrógeno también en vida libre, "ex planta", y crecer a partir del nitrógeno molecular como única fuente de nitrógeno (Dreyfus et al., 1983). Aunque posee un tiempo de generación similar al de los rizobios de crecimiento rápido (Rhizobium), recientes estudios taxonómicos sugieren que, desde un punto de vista evolutivo, Azorhizobium se encuentra relacionado con Bradyrhizobium y Xanthobacter. Estos mismos estudios relacionan a Rhizobium más íntimamente con Agrobacterium que con

Bradyrhizobium (Hennecke y col., 1985; Dreyfus y col., 1988).

Finalmente, y con posterioridad al 1 de Enero de 1989, se ha descrito una nueva especie dentro del género Rhizobium, R. galegae (Lindström, 1989). En la Tabla I se incluye la relación de especies bien caracterizadas que comprenden los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium y Azorhizobium.

TABLA I. Relación de especies bien caracterizadas que comprenden los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium y Azorhizobium.

Género Especie	Hospedador Habitual
<u>Rhizobium</u>	
<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago</u> (alfalfa), <u>Melilotus</u> , <u>Trigonella</u> *
<u>R. leguminosarum</u>	
<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u>	<u>Phaseolus</u> (judía, frijol)
<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>viciae</u>	<u>Pisum</u> (guisante), <u>Vicia</u> (arveja), <u>Lathyrus</u> , <u>Lens</u> (lenteja) *
<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>trifolii</u>	<u>Trifolium</u> (trébol)
<u>R. loti</u>	<u>Lotus</u>
<u>R. galegae</u>	<u>Galega</u>
<u>Bradyrhizobium</u>	
<u>B. japonicum</u>	<u>Glycine</u> (soja)
<u>Sinorhizobium</u>	
<u>S. fredii</u>	<u>Glycine</u> (soja)
<u>S. xinjiangensis</u>	<u>Glycine</u> (soja)
<u>Azorhizobium</u>	
<u>A. caulinodans</u>	<u>Sesbania</u>

* Las estirpes de la misma especie pueden nodular uno o varios de los hospedadores descritos.

3.- ETAPAS DE LA NODULACION

Con la única excepción conocida de la ulmácea Parasponia (Trinick y Galbraith, 1980), sólo los miembros de la familia Leguminosae son capaces de establecer simbiosis con las bacterias rizobiáceas. Los rizobios son habitantes del suelo, y aunque los nódulos se forman casi exclusivamente en las raíces de las plantas hospedadoras, se han descrito nódulos efectivos en los tallos de los géneros Sesbania, Aeschynomene y Neptunia (Dreyfus y col., 1984). A medida que se van obteniendo más datos, va aumentando la evidencia de la complejidad del proceso de nodulación; el tipo de infección es gobernada en gran parte por el genoma del hospedador, y dependiendo de la leguminosa, algunas de las etapas muestran variaciones o incluso desaparecen, por ello es muy difícil hablar de un esquema de infección general, si bien podemos diferenciar dos grandes etapas: una etapa de "patogénesis", en la que las bacterias colonizan e infectan la raíz hospedadora, y una etapa "mutualista", que desemboca en la formación de un nódulo operativo (Fig. 1).

ESQUEMA DE VINCENT

ALTERNATIVAS

Colonización

Unión

Curvatura del
pelo radical

Entrada a través
de fisuras o e-
pidermis intacta

Infección
(entrada a la raíz)

Iniciación del
nódulo (división
de células meris-
temáticas)

Liberación de
las bacterias

Retención de las
bacterias en
cordones de in-
fección

Diferenciación
en bacteroides

Fijación de
nitrógeno

Mantenimiento
del nódulo

Figura 1.- Posible secuencia de la formación de nódulos fija-
dores de nitrógeno. Tomada de Sprent, 1989.

El prelude a la infección de la raíz es la multiplica-
ción de los rizobios y la colonización de la rizosfera. Pare-
ce ser que tanto la quimiotaxis (Busnby, 1982; Götz y
Schmitt, 1987), probablemente favorecida por sustancias
procedentes de la planta (Caetano-Anollés y col., 1988), como
la electrotaxis (Miller y col., 1986a) son dos mecanismos

implicados en la colonización. Es en este momento cuando tienen lugar fenómenos de competitividad, tanto entre rizobios como entre éstos y otros microorganismos del suelo, y es también durante este periodo de multiplicación cuando los genes bacterianos responsables de las etapas iniciales de la nodulación (denominados genes nod) son activados o inhibidos por compuestos flavonoides exudados por el hospedador (ver apartado 7.2 de Introducción).

Continuando con el tradicional esquema de Vincent (1980), el siguiente paso sería el contacto entre la raíz de la planta hospedadora y la célula bacteriana. Sin embargo, es conveniente destacar en este punto que la división de las células meristemáticas del interior del córtex radical, que dará lugar a la formación del nódulo, puede ser estimulada por los rizobios (probablemente debido a la producción de factores difusibles) antes de que la infección propiamente dicha tenga lugar. Por ejemplo, tanto en soja como en alfalfa, la división celular precede a la infección del pelo radical (Calvert y col., 1984; Dudley y col., 1987).

El éxito de la infección va a depender de si la combinación planta-rizobio es compatible, ya que, en general, el rango de hospedador de una determinada especie de rizobio es limitado, habiéndose postulado varias hipótesis para explicar esta especificidad de hospedador. La más antigua se basa en la producción de lectinas (glucoproteínas) por parte de la célula vegetal, que reconocen y se unen específicamente a residuos hidrocarbonados de la célula bacteriana (Dazzo y

Truchet, 1983). Sin embargo, aunque la mayoría de los autores están de acuerdo en que las lectinas están implicadas de alguna manera en el proceso de reconocimiento, estas proteínas no son las únicas responsables de la especificidad. Así, la presencia de polisacáridos en la superficie de los rizobios parece también ser esencial para el proceso de infección (Finan y col., 1985; Vandebosch y col., 1985), existiendo al menos cuatro grupos de ellos: polisacáridos extracelulares (EPS), polisacáridos capsulares (CPS), lipopolisacáridos (LPS) y α -1,2-glucanos. Aunque existe una gran controversia sobre el papel que cada polisacárido juega en las diferentes etapas de la nodulación, se apunta la posibilidad de que alguno de ellos reaccione con lectinas u otras moléculas producidas por la raíz de la planta hospedadora (Bal y col., 1978; Sprent, 1989). Finalmente, se han asociado asimismo a la unión bacteria-raíz algunas estructuras eucariotas, como las fibrillas de celulosa (Smit y col., 1987), o procariotas, como los pili (Vesper y Bauer, 1986) o las adhesinas (proteínas que se unen al calcio, posiblemente responsables de la formación de agregados bacterianos) (Smit y col., 1987).

Una vez que los rizobios han tomado contacto con la raíz de la planta, pueden darse varias alternativas para la infección, a su vez dependientes del hospedador: entrada vía pelos radicales, entrada a través de fisuras de la epidermis vegetal, entrada a través de la epidermis intacta, y por último, el caso particular de la no leguminosa Parasponia.

El método de entrada más ampliamente utilizado es a tra-

vés de los pelos radicales, siendo ésta la forma en la que normalmente son infectadas la mayoría de las leguminosas agronómicamente importantes, como la alfalfa, el trébol, la soja, el guisante y la judía (Fig. 2). La presencia de las bacterias va a inducir deformaciones (curvaturas, ramificaciones) de los pelos radicales en la que los rizobios quedan atrapados; deformaciones, que al igual que la posterior infección, pueden depender de la presencia de polisacáridos de superficie (Halverson y Stacy, 1986).

Posteriormente, y en el punto de contacto con la bacteria, la pared celular del pelo radical se invagina para formar una estructura tubular, el cordón de infección, que, precedido por el núcleo de la célula del pelo radical, avanza hasta la base de esta célula, atraviesa la pared de la célula adyacente y continúa avanzando a través de varias capas de células corticales externas, conduciendo así a los rizobios en dirección al interior del córtex radical, donde la división meristemática está teniendo lugar. Dicho cordón de infección está formado por material de la pared celular vegetal que envuelve a los rizobios, los cuales se encuentran embebidos en una matriz que puede ser parcialmente de origen bacteriano, pero que también tiene glucoproteínas del hospedador (Bradley y col., 1988); la estructura completa está rodeada por una membrana formada por la extensión de la membrana invaginada.

En cuanto a la entrada a través de fisuras (mecanismo de "crack"), ésta se ha descrito en detalle en los géneros tro-

cales Arachis y Stylosanthes (Chandler, 1978; Chandler, 1982), donde los rizobios penetran por el punto donde emergen las raíces laterales (donde aparecerán posteriormente los nódulos) y se multiplican en los espacios intercelulares; en estos géneros no se ha descrito la formación de cordones de infección. Es curioso el hecho de que Azorhizobium infecta las raíces de Sesbania por el método clásico de curvatura del pelo radical y formación de cordones de infección (Olsson y Rolfe, 1985), mientras que la entrada en los tallos ocurre por un mecanismo parecido al encontrado en Arachis y Stylosanthes, empezando por la penetración a través de los espacios intercelulares de las células basales, y posterior formación de un cordón de infección (Tsien y col., 1983; Duhoux, 1984). Esto nos demuestra que es la planta, y no la bacteria, la que controla el tipo de infección. De igual forma, algunas estirpes de Bradyrhizobium penetran en algunos de sus hospedadores vía pelos radicales y en otros vía fisuras.

La tercera modalidad ha sido descrita muy recientemente en algunas leguminosas leñosas, como Mimosa scabrella (Faria y col., 1988), en las cuales no se ha observado la entrada de rizobios ni a través de pelos radicales "típicos" (no producen regularmente pelos), ni a través de heridas (los nódulos no estaban asociados a raíces laterales), pero sí se formaban nódulos en las raíces jóvenes, aparentemente intactas.

Por último, Rhizobium y Bradyrhizobium penetran en las raíces de la planta no leguminosa Parasponia mediante estimulación de determinadas zonas de división celular, lo que ori-

gina una ruptura local de la epidermis; una vez en los espacios intercelulares del córtex, se forman los cordones de infección, pero no se ha observado la formación de éstos a partir de pelos radicales (Lancelle y Torrey, 1984).

Actualmente está claro que la iniciación de la división celular en el córtex no es consecuencia de la infección. Como se señaló al principio, las divisiones corticales pueden (y posiblemente lo hagan) preceder a la entrada en la raíz; sin embargo, si estas células que se dividen van a ser organizadas en un nódulo, parte de ellas tendrá que ser infectada por las bacterias. Una vez que alcanza el meristemo, el cordón de infección se ramifica, extendiéndose entre las células en división, y penetrando en muchas de ellas; los rizobios son entonces liberados en el citoplasma de las células hospedadoras por un mecanismo de endocitosis, quedando rodeados por una envuelta de origen vegetal, la membrana peribacteroidal; entonces se dividen, en mayor o menor extensión dependiendo de la especie, y aumentan su tamaño hasta convertirse en bacteroides pleomórficos, que son activos en la fijación de nitrógeno. Otras células quedan sin invadir y se diferencian en células especializadas, como las que forman el tejido vascular periférico o las estructuras externas del nódulo, además de las células intersticiales, ricas en vacuolas, cuya función parece ser la de mantener y nutrir a las células que contienen bacteroides (Vance y col., 1988).

En otros casos, las células vegetales pueden ser invadidas por una "zooglea" (no un cordón de infección organizado),

siendo los nódulos que se forman típicos de los géneros Ara-
chis, Stylosanthes, Aeschynomenes y Dalbergia; en estos casos
no se ha descrito la formación de cordones de infección ni
células intersticiales (Sprent y Faria, 1988).

Un tercer caso, mucho más extremo, ocurre en algunos nódulos de leguminosas primitivas (Faria y col., 1987), y en la ulmácea Parasponia, donde Rhizobium y Bradyrhizobium fijan nitrógeno atmosférico retenidos en los cordones de infección (Lancelle y Torrey, 1984). Antes de este descubrimiento se creía que la liberación de la bacterias a partir de los cordones de infección era un requisito imprescindible para el normal funcionamiento del nódulo, pero ahora es obvio de que se trata de otra característica determinada por la planta hospedadora (Sprent, 1989). Así, nos encontramos con la paradoja de que mientras en algunas simbiosis las bacterias no se encuentran nunca confinadas en un cordón de infección, en otras nunca van a ser liberadas a partir de los mismos, y todo ello gobernado por el genoma de la planta hospedadora.

El estado final de diferenciación a bacteroide es acompañado por bastantes transformaciones; los metabolismos de ambos simbiosis se hacen complementarios y cada uno estimula al otro a producir "de novo" o a incrementar la síntesis de sustancias específicas: bacteroidinas (por los bacteroides) como la nitrogenasa, enzima que cataliza la reducción del nitrógeno molecular a amonio), y nodulinas (por la planta). Estas últimas ha sido estudiadas extensivamente, aunque se han caracterizado muy pocas, pudiendo variar desde enzimas

(como las uricasas) a componentes de la membrana peribacteroidal o pigmentos (como la leghemoglobina) (Govers y col., 1987; Jorgensen y col., 1988; Konieczny y col., 1988). La leghemoglobina se combina con el oxígeno dando lugar a oxileghemoglobina, de esta forma se consigue regular el nivel de oxígeno, proporcionando energía a los bacteroides mientras que la nitrogenasa (sensible al oxígeno) permanece activa; hay que destacar que la síntesis de la leghemoglobina se realiza en cooperación, siendo el grupo hemo producido por la bacteria y la parte proteica por la planta hospedadora.

Aunque inicialmente se pensó que las nodulinas eran proteínas específicas de los nódulos, hoy existen pruebas de que muchas de ellas son sólo proteínas cuya síntesis es intensificada en los nódulos; así, se sabe que los genes que codifican la síntesis de la apoproteína de la leghemoglobina (considerada como la nodulina más característica de los nódulos de las leguminosas) se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, incluyendo plantas no leguminosas e incluso no angiospermas, y que a veces son expresados, aunque a muy bajo nivel (Bogusz y col., 1988).

Como resultado de la colaboración metabólica, la nitrogenasa sintetizada por los bacteroides reduce el nitrógeno a amonio, que es exportado al citosol de la planta hospedadora y asimilado por la vía glutamino sintetasa; la planta reduce el dióxido de carbono a azúcares durante la fotosíntesis, y los conduce al nódulo, donde la bacteria los utiliza como fuentes de carbono y energía (fotosintatos).

Como ya mencionamos, a diferencia de Frankia o de las cianobacterias diazotróficas, y con la única excepción conocida de Azorhizobium, los rizobios en vida libre no pueden utilizar el nitrógeno atmosférico como única fuente de nitrógeno; curiosamente, aunque durante la simbiosis la fijación es fuertemente estimulada, la glutamino sintetasa bacteriana se encuentra inhibida, por lo que el amonio no puede ser utilizado por los bacteroides y así los productos de la fijación son utilizados completamente para el beneficio de la planta hospedadora.

Los nódulos formados en las leguminosas se pueden clasificar en tres grupos principales de acuerdo a su forma, a su actividad meristemática y a los productos nitrogenados que transportan: 1) nódulos indeterminados: cilíndricos, con meristemo apical, que asimilan el nitrógeno fijado en amidas, como los de la alfalfa, el guisante y el trébol, 2) nódulos determinados: esféricos, con meristemo interno, que asimilan el nitrógeno fijado en ureidos, como los del frijol y la soja, y 3) nódulos crotaloides, que rodean la raíz primaria, como los de Lupinus alba (Vance y col., 1988).

4.- ESTRATEGIAS Y METODOS GENETICOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS DE LOS GENES BACTERIANOS QUE INTERVIENEN EN LA SIMBIOSIS

Las manipulaciones genéticas en la rizobiáceas no son tan fáciles como en las enterobacterias. Además, el análisis de los genes es complicado debido a que las bacterias en vida libre no se diferencian en bacteroides ni exhiben ningún fenotipo simbiótico; así, para observar un defecto en alguna etapa de la simbiosis se hace necesario ensayar clones individuales en plantas independientes. Desde que se inició el estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa, se han empleado numerosas técnicas que han contribuido a la identificación, clonación y caracterización de los genes simbióticos. A fin de simplificar, en lo sucesivo utilizaremos el término "Rhizobium" cuando nos estemos refiriendo a los cuatro géneros (Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium y Azorhizobium) como a un grupo.

4.1.- Identificación de de los genes simbióticos

4.1.1.- Experimentos de transferencia de material genético

Entre células de "Rhizobium", la transferencia de material genético se puede llevar a cabo bien por transducción (Buchanan-Wollaster, 1979; Casadesús y Olivares, 1979; Shan y col., 1981; Finan y col., 1984), o por conjugación, que es el método más ampliamente utilizado.

La mayoría de las especies de "Rhizobium" poseen grandes plásmidos, detectables por técnicas de electroforesis en gel de agarosa (Eckhardt, 1978). Muchos de estos plásmidos contienen genes necesarios para la simbiosis, por lo que se denominaron plásmidos simbióticos o plásmidos Sym (pSym) (Hooykaas y col., 1981). La transferencia por conjugación de plásmidos Sym es una estrategia muy útil para identificar genes que intervienen en la simbiosis, a la vez que se obtienen estirpes con nuevas propiedades simbióticas; la cepa receptora para estos experimentos puede ser una estirpe silvestre, una estirpe (de la misma o diferente especie) afectada en su capacidad simbiótica, o incluso otros géneros, como Agrobacterium, siendo A. tumefaciens la especie más utilizada.

El primer experimento de este tipo fue realizado por Johnston y col. (1978), que confirieron a dos estirpes de las biovariedades trifolii y phaseoli de R. leguminosarum (que nodulan trébol y judía, respectivamente) la capacidad de nodular guisante, el hospedador de R. leguminosarum bv. viciae, cuando les introdujeron por conjugación el plásmido simbiótico de esta biovariedad. Hoy se sabe que no todas las especies de "Rhizobium" pueden expresar el rango de hospedador de otra especie tras haber recibido su plásmido simbiótico (ver apdo. 6 de la Introducción).

Los plásmidos Sym pueden ser autotransmisibles, como sucede en algunas estirpes de las biovariedades trifolii, phaseoli y viciae de R. leguminosarum (Higashi, 1967; Johnston y col., 1978; Beynon y col., 1980; Hooykaas y col., 1981;

Rolfe y col., 1981; Lamb y col., 1985); sin embargo, ésta no es una característica general de todos los representantes de *R. leguminosarum*, y en otros casos, como en los plásmidos Sym de *R. meliloti* o *S. fredii*, no se ha observado la autotransmisibilidad (Kondorosi y col., 1982; Appelbaum y col., 1985).

La movilización de un plásmido no transmisible, o del cromosoma, se puede lograr mediante su cointegración con otro plásmido que sí lo sea, habiéndose usado fundamentalmente para este fin plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP-1 (ver 4.2.1 de Introducción), como R68 (Kondorosi y Johnston, 1981) o su derivado R68.45 (Scott y Ronson, 1982). Alternativamente, y en vez de usar el propio plásmido autotransmisible, se puede introducir su secuencia de movilización (*mob*, que básicamente lleva el origen de transferencia) en el plásmido que se desea conjugar; en este caso, se necesita también un tercer plásmido, el "helper", que proporcione los genes de transferencia (*tra*) en "trans" (ver apdo.. 4.2.1 de Introducción) (Kondorosi y col., 1982; Simon y col., 1983a; Appelbaum y col., 1985).

Mientras que en los ejemplos citados anteriormente se logró la transferencia conjugativa de los plásmidos simbióticos completos, en otras ocasiones la cointegración con plásmidos del tipo RP4 condujo a la formación de una serie de plásmidos derivados, de menor tamaño que el autóctono de "*Rhizobium*", denominados R-primas. Así, tras la movilización de los cointegrados RP4-pSym a *E. coli*, se obtienen una serie de R-primas que contienen la secuencia de RP4 junto con gran-

des segmentos del correspondiente plásmido de "Rhizobium"; puesto que los R-primas reducen el tamaño de los plásmidos a estudiar, éstos han sido muy útiles para la localización de regiones simbióticas (Banfalvi y col., 1983; Julliot y col., 1984; Engwall y Atherly, 1986; Nayadu y Rolfe, 1987).

La transferencia de material genético desde E. coli hasta "Rhizobium" se puede llevar a cabo por transformación (Selvaraj e Iyer, 1981; Hatterman y Stacy, 1990) o más frecuentemente por conjugación; para lo último se han desarrollado una serie de vectores de clonación que deben ser estables, movilizables y capaces de replicarse tanto en E. coli como en "Rhizobium" (ver apdo. 4.2 de Introducción).

4.1.2.- Eliminación de material genético

Un procedimiento muy eficaz para la identificación de funciones simbióticas es la eliminación de dichas funciones. En el caso más extremo, si la curación de un determinado plásmido va acompañada de la desaparición de un fenotipo simbiótico, podemos concluir que los genes de interés se localizan en dicho plásmido. En "Rhizobium", la curación de plásmidos se consigue generalmente mediante una prolongada exposición de las células a elevadas temperaturas; tras la descripción inicial del método en R. leguminosarum bv. trifolii (Zurkowski y col., 1978), la técnica ha demostrado su utilidad en otras especies (Banfalvi y col., 1981; Morrison y col., 1983; Toro y Olivares, 1986; Rodríguez-Quiñones y col.,

1989). En lugar de la curación total, también es posible provocar deleciones internas en plásmidos (Banfalvi y col., 1981; Soberón-Chavez y col., 1986; Toro y Olivares, 1986) o en el cromosoma (Skogen-Hagen-son y Atherly, 1983; Hahn y col., 1984); como ya mencionamos, otra forma de generar deleciones es mediante la construcción de R-primas.

4.1.3.- Mutagénesis al azar

La mutagénesis es una herramienta muy importante con fines genéticos. La mutagénesis al azar, bien con agentes químicos, físicos, o con transposones, tales como Tn5, que además de poseer las funciones de transposición codifican la resistencia a uno o más antimicrobianos, ha facilitado el seguimiento de la simbiosis mediante el análisis de mutantes de "Rhizobium" que son defectivos en alguna de las etapas de la formación del nódulo, o en su funcionamiento (Ma y col., 1982; Meade y col., 1982; Ferrai y col., 1983; Chua y col., 1984; Noel y col., 1984; So y col., 1987; Van den Eede y col., 1987). Una ventaja muy importante de la mutagénesis con transposones es que una vez que se ha creado una mutación simbiótica, el gen mutado puede ser clonado directamente en E. coli, seleccionando el fragmento de ADN que confiere la resistencia codificada por el transposón; el mismo gen, no mutado, se puede aislar entonces a partir de un banco de genes usando el gen mutado como sonda de hibridación (ver apdo. 4.2.3. de Introducción).

4.2.- Clonación de genes simbióticos

La clonación de un gen de interés requiere la construcción de un banco de genes, o genoteca, de la estirpe silvestre de donde se quiere aislar dicho gen; en el caso de las bacterias rizobiáceas, la estrategia está basada en la utilización de vectores de clonación de amplio espectro de hospedador, esto es, que se repliquen tanto en E. coli como en "Rhizobium" y que puedan ser transferidos desde E. coli hasta "Rhizobium" por conjugación. Además de su empleo como vehículos de clonación, muchos de ellos se han utilizado en el mapeo de cromosomas de distintas especies (Forrai y col., 1983; Megías y col., 1982), en la movilización de plásmidos indígenas no transmisibles o en la formación de R-primas (ver apdo. 4.2.1 de Introducción); por ello, puede decirse que han contribuido en gran medida al avance de la genética de "Rhizobium". Desde 1980 se han venido utilizando fundamentalmente dos grupos de vectores, que a continuación resumimos:

4.2.1.- Plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP-1

Los representantes de este grupo son plásmidos de elevado peso molecular (30 kilobases o más) y bajo número de copias (menos de 10 copias por cromosoma). Los estudios se han centrado fundamentalmente en el plásmido RK2 (Meyer y col., 1977) y sus derivados, que han proporcionado la base para los vehículos de clonación más ampliamente usados. Tanto RK2 como

los plásmidos derivados de él exhiben un rango de hospedador muy amplio, pudiendo mantenerse establemente en enterobacterias, Pseudomonas, Acinetobacter, "Rhizobium" y Agrobacterium, además de en otras muchas bacterias Gram negativas (ver Schmidhauser y col., 1988 para revisión). RK2, que es similar a RP1, RP4, R18 y R68 (Schmidhauser y col., 1988), posee un tamaño molecular de 56,4 kb, los genes necesarios para la replicación -OriV (origen de replicación), trfA y trfB-, funciones de transferencia -OriT (origen de transferencia, también denominado región mob) y genes tra, y confiere resistencia a kanamicina, tetraciclina y ampicilina (Meyer y col., 1977; Fig. 3a).

En los plásmidos derivados de RK2 se ha eliminado la mayoría del ADN no esencial, reduciéndose el tamaño molecular, lo que supone una mejora para su utilización como vectores de clonación. Entre ellos, pRK290 (20 kb, Fig. 3b, Ditta y col., 1980) es el más extensamente conocido y utilizado como vehículo de clonación; dicho plásmido contiene secuencias de reconocimiento únicas para las endonucleasas EcoRI y BglII, en las que se puede insertar el ADN a clonar, codifica resistencia a tetraciclina y sigue manteniendo las funciones de replicación y el origen de transferencia (OriT) de RK2, pero no posee los genes tra, necesarios para la conjugación; por ello, aunque este vector puede replicar establemente, no puede ser transferido a menos que le sean proporcionados los genes tra por un plásmido "helper", como pRK2013 o pRK2073 (Figursky y Helinsky, 1979), en los que dichos genes tra han

sido clonados en replicones ColE1. Típicamente, pRK290 se transfiere desde E. coli hasta "Rhizobium" en una conjugación "triparental", en la que la cepa receptora de "Rhizobium" se mezcla simultáneamente con una estirpe de E. coli que contiene pRK290 y otra que alberga el plásmido "helper". Aunque tanto el "helper" como pRK290 pueden ser transferidos a "Rhizobium", sólo se mantendrá pRK290.

Por otro lado, pRK290 ha sido modificado a objetos de proporcionar otros marcadores selectivos y sitios de restricción adicionales; tal es el caso de los plásmidos derivados pRK293 (Ditta y col., 1985) y pVK101 (Knauf y Nester, 1982). En otros derivados de pRK290 se ha reducido aún más el tamaño, como en pRK404 (Ditta y col., 1985; Fig.3c), en el que además se ha introducido un polilinker (con numerosos sitios de restricción) fusionado al gen lacZ de E. coli, que codifica la síntesis de la enzima β -galactosidasa; esto permite la selección de recombinantes mediante un fácil ensayo en placas (ver).

En otros derivados de pRK290 se ha clonado el sitio cos del bacteriófago lambda, transformándose en cósmidos, con la gran ventaja de poder ser empaquetados "in vitro", la forma más eficiente hasta ahora conocida de transferencia de ADN, y por tanto convirtiéndose en idóneos para la construcción de bancos de genes.

El primero de tales cósmidos fue pLAFR1 (Friedman y col., 1982; Fig 4a) en el que se han construido bancos de genes de numerosas especies de "Rhizobium", como R. meliloti

(Long y col., 1982); pLAFR1 (21.6 kb) posee un único sitio EcoRI y codifica resistencia a la tetraciclina. Knauf y Nester (1982) añadieron a pRK290 el marcador de resistencia a la kanamicina, el sitio cos de lambda y secuencias de reconocimiento para las endonucleasas HindIII, XhoI, SalI, EcoRI y BglII; el resultado fue el cósmido pVK100, a partir del cual se originó pVK102 por eliminación del sitio EcoRI (Knauf y Nester, 1982; Fig. 4b). pVK100 y pVK102 tienen sobre pLAFR1 la ventaja de poseer más sitios únicos de restricción, inactivando muchos de ellos alguno de los dos marcadores que poseen; por otro lado, el tamaño de los tres cósmidos (aproximadamente 20 kb) les confiere una capacidad de clonación de 25-35 kb, con las que se obtendría un peso total adecuado para el empaquetamiento (Hohn, 1979); no obstante, en caso de utilizar alguno de los tres cósmidos se aconseja desfosforilar los extremos 5' de los mismos, al objeto de evitar auto-ligaciones, las cuales, por su peso, serían empaquetables.

Más recientemente se han construido otros cósmidos similares a los anteriores pero de menor tamaño, como el vector pGS72, de 13 kb (Selvaraj y Iyer, 1985), cuya utilización no requiere el tratamiento previo con fosfatasa alcalina ya que la posibilidad de empaquetamiento es más remota, al requerirse la formación de un tetrámero para alcanzar un tamaño adecuado.

4.2.2.- Plásmidos del grupo de incompatibilidad IncQ

Los representantes del grupo de incompatibilidad IncQ son generalmente plásmidos pequeños (menos de 10 kb) de alto número de copias (40 o más copias por cromosoma en algunos hospedadores) (Barth y Grinter, 1974; Nagahari y Sakaguchi, 1978). Aunque no autotransmisibles, pueden ser movilizados por el sistema de transferencia (genes tra) de plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncN, IncW e IncP-1 (Barth y col., 1981) y, al igual que estos últimos, poseen un espectro de hospedador muy amplio entre bacterias Gram negativas (Schmidhauser y col., 1988).

Dentro de este grupo, la mayoría de los estudios han recaído sobre una serie de plásmidos similares: RSF1010, R300B, R1162 y NTP2 (Barth y Grinter, 1974; Heffron y col., 1975) y sus derivados. El plásmido pRSF1010 (8,9 kb) contiene las funciones esenciales para la replicación: ori (origen de replicación), repA, repB y repC, el origen de transferencia (nic) y genes de resistencia a la tetraciclina, y sulfonamida (Bagdasarian y col., 1981; Scholz y col., 1985). Simon y col. (1983b) insertaron las funciones de replicación y movilización (nic) de pKT210 (un derivado resistente al cloranfenicol de RSF1010) en pACY184, pBR325 y pACY177, resultando pSUP104, pSUP204 y pSUP304, respectivamente; la introducción de la secuencia cos de lambda en el sitio PstI de pSUP104 originó el cósmido pSUP106 (Simon y col., 1983).

4.2.3.- Estrategias de clonación

Una vez construido el banco de genes de la estirpe silvestre de "Rhizobium", podemos seguir básicamente dos estrategias para clonar el gen o los genes deseados, y puesto que son objeto de estudio en esta Tesis, los ejemplos que se citen estarán referidos fundamentalmente a los genes de nodulación (ver apdo 7 de Introducción).

- Complementación

Es el único método que demuestra la funcionalidad de los genes clonados. El banco de genes se conjuga "en masa" con un mutante simbiótico o un derivado deletado o curado de "Rhizobium"; la mezcla de transconjugantes es entonces inoculada en plantas y son éstas las que directamente seleccionan las bacterias que llevan un plásmido que complementa la mutación, o lo que es lo mismo, que contiene los genes de interés. De esta forma, Long y col. (1982) aislaron los genes de la nodulación de R. meliloti 1021, a partir de una genoteca construida en el cósmido vector pLAFR1 que se utilizó para complementar a un mutante Nod⁻ de R. meliloti.

Muchos otros genes simbióticos se han clonado por este procedimiento, tal es el caso de las regiones de nodulación de B. japonicum sp. (Parasponia) (Marvel y col., 1987), R. leguminosarum bv. phaseoli 8002 (Lamb y col., 1982), Rhizobium sp. MPIK3030 (Bachem y col., 1985) o Azorhizobium cauli-

nodans (Van den Eede y col., 1987), entre otras.

- Hibridación "in situ"

Consiste en usar la genoteca como blanco para un gen previamente clonado, pudiendo diferenciarse dos casos generales:

-Identificación y clonación de genes simbióticos usando como sonda de hibridación un gen (o genes) clonado previamente a partir de otra especie. Este procedimiento aprovecha el alto grado de conservación existente entre genes simbióticos de diferentes especies de "Rhizobium". Así por ejemplo, utilizando los genes de nodulación de R. meliloti como sonda radioactiva, Russel y col. (1985) y Ramakrishnan y col. (1986) clonaron las regiones homólogas de B. japonicum y S. fredii, respectivamente.

-Identificación y clonación de genes simbióticos usando la versión mutada del gen que se desea clonar como sonda de hibridación frente a un banco de genes de la estirpe silvestre (ver apdo. 4.1.3 de Introducción). Entre otros ejemplos, de esta forma se han clonado los genes de la nodulación de R. leguminosarum bvs. trifolii (Schofield y col., 1984) y viciae (Downie y col., 1983), usando para ello vectores del grupo de incompatibilidad IncQ.

4.3.- Caracterización de genes simbióticos

Los métodos utilizados para la completa caracterización de una determinada región de ADN incluyen el mapeo físico con endonucleasas de restricción, la mutagénesis dirigida, la determinación de la secuencia nucleotídica y la realización de fusiones génicas.

Una de las técnicas genéticas más poderosas usadas en la investigación de "Rhizobium" es la mutagénesis dirigida, desarrollada en 1980 por Ruvkun y Ausubel para establecer el funcionamiento de las secuencias nif (ver apdo 5.4.1 de Introducción) en R. meliloti. En el método inicialmente descrito, las células de E. coli que albergan la región de ADN clonada son sometidas a mutagénesis con un transposón; los fragmentos clonados que llevan insertado el transposón se identifican por aislamiento y mapeo físico, tras lo cual son reclonados en un vector de amplio rango de hospedador, tal como pRK290 (Ditta y col., 1980) y conjugados desde E. coli hasta "Rhizobium". Aquellas células en las cuales el fragmento mutado se ha recombinado en el genoma y reemplazado a la copia silvestre se pueden obtener seleccionando el marcador del transposón (por ejemplo neomicina para Tn5) mientras que se introduce en las células un plásmido incompatible con el vector donde la copia mutada estaba clonada. El resultado es una cepa con una inserción mapeada con precisión en una secuencia de interés; si esta secuencia es un gen funcional se puede investigar ahora ensayando su

fenotipo en plantas.

La mutagénesis dirigida, actualmente modificada y mejorada (Marvel y col., 1987), ha sido una técnica indispensable para el estudio de la genética de la simbiosis (Kondorosi y col., 1984; Djordjevic y col., 1985b; Jacobs y col., 1985; Marvel y col., 1987; Göttfert y col., 1989).

El procedimiento normalmente utilizado para estudiar la expresión y regulación de un gen determinado es la fusión génica; en este caso, los promotores de los genes de interés son fusionados a genes informadores, a los que se les ha eliminado su propio promotor y cuyo producto sea fácil de ensayar. El gen lacZ de E. coli, que codifica la síntesis de la enzima β -galactosidasa, ha sido ampliamente utilizado, fundamentalmente por la simplicidad del ensayo y su fácil cuantificación (Mulligan y Long, 1985; Rossen y col., 1985); otros ejemplos de genes informadores son los que codifican la resistencia a un antibiótico, como el gen cat (cloranfenicol acetil-transferasa) (Rogowsky y col., 1986), o la producción de bioluminiscencia, como los genes lux (Legocki y col., 1986) y luc (Palomares y col.,).

En este apartado hemos intentado resumir varias estrategias que han sido de gran utilidad para la manipulación del genoma de "Rhizobium"; sin embargo, se publican continuamente nuevos métodos, entre ellos, la descripción de una técnica que permite la construcción de estirpes de "Rhizobium" que son receptivas al bacteriófago lambda (Ludwig, 1987). Las es-

pecies de "Rhizobium" son normalmente resistentes a la infección por lambda y este hecho ha impedido la utilización de las numerosas técnicas basadas en dicho bacteriófago para el estudio de la genética de las rizobiáceas; el uso de cepas receptoras de lambda permitirá en adelante la aplicación de estas técnicas, proporcionando a los genetistas otro método para la transferencia de genes.

Para terminar con este apartado, es necesario llamar la atención a algunas restricciones específicas impuestas por las características del genoma de "Rhizobium", es decir, la presencia de múltiples copias de genes y la necesidad de manipular grandes segmentos del genoma.

Con respecto al primer problema, la reiteración de ADN es reconocida como una característica general del genoma de "Rhizobium" (Flores y col., 1987); este nivel de reiteraciones es inusual en organismos procariotas, habiéndose encontrado casos similares sólomente en especies de Halobacterium (Sapienza y Doolittle, 1982) y Streptomyces (Schrempf, 1983). Esto supone un serio problema para el análisis genético, especialmente cuando se intenta la mutagénesis de genes presentes en múltiples copias, lo que obliga a mutar cada copia por separado, procedimiento excesivamente laborioso y que no siempre se consigue. Una alternativa podría ser el ARN anti-sentido o mic RNA (de mRNA-interfering complementary RNA) (Coleman y col., 1984; Izan y Weintraub, 1984); la estrategia está basada en el hecho de que ARNs complementarios a un ARN mensajero pueden inhibir la expresión de un gen por for-

mación de un dúplex de ARN, lo que permite la silenciación de una familia completa de genes.

Con respecto al segundo inconveniente, existen interesantes perspectivas, como el descubrimiento de endonucleasas de restricción que reconocen secuencias de ocho pares de bases, o la posible utilización de una serie de técnicas electroforéticas llamadas en conjunto PFGE (Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis), que consiguen una mejora en la eficiencia de separación de moléculas de ADN de tamaño elevado (Cantor y col., 1988). El uso de estas enzimas y las técnicas de PFGE permitió la fragmentación del genoma de *E. coli* en 22 piezas y la construcción de un mapa físico del cromosoma completo de esta enterobacteria (Smith y col., 1987). Muy posiblemente, estos métodos se usarán en un futuro muy próximo en los estudios sobre "Rhizobium", lo que nos ayudará a obtener una visión comprensible de su genoma de forma global.

5.- GENES SIMBIOTICOS BACTERIANOS

Como se ha mencionado, la formación de nódulos fijadores de nitrógeno es un proceso complejo, en el que intervienen muchos genes de ambos organismos de manera coordinada, de forma que existe una continua comunicación, un flujo constante de señales -muchas aún sin identificar-entre la planta hospedadora y su simbiote; esto hace necesario estudiar la simbiosis no desde un punto de vista unilateral, sino más bien considerando la interacción planta-bacteria. A pesar de todo ello, en este apartado únicamente nos referiremos a los genes bacterianos que intervienen en la simbiosis, dejando a un lado los de la planta, no menos importantes pero que escapan a los objetivos de esta Tesis.

La aplicación de las técnicas de ADN recombinante al estudio de la fijación biológica de nitrógeno ha proporcionado una lista cada vez más creciente de genes bacterianos que intervienen en la simbiosis: la relación con la planta es iniciada por genes que codifican sistemas por los cuales la bacteria reconoce y se aproxima a la raíz; moléculas señales, como los flavonoides, median en una compleja interacción de los genes de nodulación de la planta y los de los rizobios, la cual desemboca en la entrada de los últimos a través del pelo radical; mientras las células meristemáticas se dividen, las bacterias se aproximan a ellas a través del cordón de infección, cuya formación depende de genes bacterianos implicados en la síntesis de polisacáridos; una vez en el córtex in-

terno, los rizobios penetran en las células vegetales en división y se diferencian en bacteroides pleomórficos; es entonces cuando se expresan los genes bacterianos que codifican la síntesis de la nitrogenasa y su regulación, además de otros genes requeridos para la entrada en el bacteroide de las fuentes de carbono y energía ofrecidas por la planta, así como para su metabolismo.

Al intentar hacer una clasificación de los genes bacterianos que intervienen en la simbiosis, nos encontramos con el problema de que en muchos casos no se conoce con certeza el papel que un determinado gen tiene en el proceso; además, no está aún muy claro si algunos genes intervienen en una sola etapa o si por el contrario están involucrados en varias de ellas. Teniendo esto en cuenta, a continuación intentaremos resumir el conocimiento actual de la genética de la simbiosis desde el punto de vista del microsimbionte, desarrollando posteriormente en profundidad el apartado de genes de nodulación, que son el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

TABLA II. RESUMEN DE LOS GENES BACTERIANOS SIMBIOTICOS

GENES REQUERIDOS PARA LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA NODULACION

- Genes de movilidad (mot,fla) y quimiotaxis (che)
- Genes tempranos de nodulación (nod)
- Genes implicados en la formación del cordón de infección y desarrollo del nódulo (exo, lps, ndv)

GENES REQUERIDOS PARA LA FIJACION DE NITROGENO EN EL NODULO

- Genes de fijación de nitrógeno (nif,fix)
 - Otros genes (dot, hem, hup)
-

5.1.- Genes de movilidad y quimiotaxis

Los genes para la síntesis de flagelos (fla), movilidad (mot) y quimiotaxis (che) han sido mapeados en el cromosoma de R. meliloti (Ziegler y col., 1986).

Aunque las cepas móviles son más competitivas que los mutates afectados en la movilidad, dichos mutantes nodulan normalmente alfalfa, por lo que estos genes no se consideran esenciales para la simbiosis (Ames y col., 1980).

Por otro lado, el análisis de mutantes ha revelado que en R. meliloti pueden existir dos vías para la quimiotaxis, una general y otra específica para exudados de la planta, que comparte algunos componentes con la primera (Bergman y col., 1988), pero que posee otros quimioatrayentes específicos, co-

mo la luteolina (Caetano-Anollés y col., 1988), un compuesto que además es un inductor de los genes nodABC (ver apdo 7.2.3 de Introducción).

5.2.- Genes tempranos de nodulación

Desde un punto de vista del fenotipo y de la denominación de los genes, la nodulación se considera como la emergencia de nódulos, funcionales o no. Los genes nod se han dividido en grupos, fundamentalmente en base a sus propiedades cuando se transfieren a otras especies de "Rhizobium" o a la bacteria afín A. tumefaciens.

Los genes del primer grupo parece codificar funciones que no son hospedador-específicas, ya que son capaces de reemplazar funcionalmente a los genes equivalentes en otras especies de "Rhizobium", pero no le confieren el rango de hospedador de la estirpe de la que provienen; estos genes están implicados en la curvatura del pelo radical y en la inducción de la organogénesis del nódulo (Kondorosi y col., 1984; Djordjevic y col., 1985a; Fisher y col., 1985; Marvel y col., 1985).

Los otros genes de nodulación confieren especificidad para nodular una determinada planta hospedadora y no son funcionalmente intercambiables entre las diferentes especies, ya que cuando son transferidos, en la mayoría de los casos se obtienen cepas receptoras que ahora nodulan al hospedador especificado por los genes que han recibido (Kondorosi y col.,

1984; Djordjevic y col., 1985a; Debelle y col., 1986).

De esta forma, los genes nod se han agrupado tradicionalmente en dos categorías: genes nod "comunes" y genes nod "específicos" (también denominados genes hcn) (Horvath y col., 1986); sin embargo, hasta que las funciones bioquímicas de estos genes terminen de dilucidarse, parece prematuro asignarlos a otra categoría genética que no sea la de nod (ver apdo. 7 de Introducción).

5.3.- Genes implicados en la formación del cordón de infección y en el desarrollo del nódulo

Este apartado se refiere fundamentalmente a los polisacáridos de superficie de "Rhizobium", cuyas categorías y características fueron revisadas por Carlson (1982); brevemente, éstos son: polisacáridos extracelulares (EPS), polisacáridos capsulares (CPS), lipopolisacáridos de la membrana externa (LPS) y α -glucanos cíclicos.

5.3.1.- Genes exo

Los genes exo participan en la síntesis de los polisacáridos extracelulares; estos genes han sido estudiados más extensivamente en R. meliloti, que produce un heteropolisacárido ácido. A los seis grupos de complementación definidos inicialmente por Leigh y col. (1985), en los que las mutaciones impedían la producción de EPS, se han ido añadiendo otros genes exo (Finan y col., 1988; Long y col., 1988a; Long

y col., 1988b). Hay que destacar que algunas mutaciones exo son pleiotrópicas, afectando también a la síntesis de -glucanos y de LPS.

Se ha comprobado que mutaciones en al menos 8 genes (exoA, exoB, exoC, exoF, exoL, exoM, exoP y exoQ) provocan la inhibición en la producción de polisacárido extracelular (Long y col., 1988b); además, se han definido otros dos genes que afectan la sustitución acídica, exoH para la succinilación (Leigh y col., 1987) y otro gen, aún sin denominar, cuya mutación da lugar a una síntesis exagerada de un EPS deficiente en los residuos terminales piruvatos (Müller y col., 1988).

Mientras que las mutaciones en todos estos genes dan lugar a nódulos no fijadores, otros genes adicionales, como exoN, exoG, exoJ, exoD y exoK tienen efectos cuantitativos en la producción de EPS, pero no en todos los casos sus mutaciones afectan a las propiedades simbióticas (Long y col., 1988b); además, se han descrito dos genes que regulan la síntesis de EPS, exoR y exoS (Doherty y col., 1988).

5.3.2.- Genes lps

Los estudios de estos genes no se encuentran tan avanzados como los de los genes exo, y se han centrado fundamentalmente en el lipopolisacárido de R. leguminosarum bv. phaseoli.

Por mutagénesis con Tn5, Noel y col. (1986) originaron

un mutante incapaz de establecer un cordón de infección normal en judía, aunque sí provocó deformaciones en los pelos radicales y estimuló la división celular en el córtex; el análisis químico del LPS de dicho mutante reveló la ausencia de su antígeno somático O (Carlson, 1987), lo que indica que se requiere un lipopolisacárido completo para sostener el proceso de infección.

Más recientemente se han clonado dos regiones de ADN que contienen genes para la síntesis del LPS (lps) de R. leguminosarum bv. phaseoli (Cava y col., 1989).

5.3.3.- Genes ndv

Los genes implicados en la síntesis y el transporte del -1,2-glucano cíclico característico de las rizobiáceas, ndvA y ndvB, se identificaron inicialmente en R. meliloti por homología con las regiones chvA y chvB de A. tumefaciens, con las que son funcionalmente intercambiables (Dylan y col., 1986).

El gen ndvB es necesario para la producción de una proteína de 235 kDa a la que el B-glucano se une durante su síntesis (Zorreguieta y Ugalde, 1986; Geremia y col., 1987), mientras que ndvA interviene probablemente en el transporte del -glucano fuera de la célula tras su síntesis (Stanfield y col., 1988).

Recientemente se han detectado genes homólogos a los ndv de R. meliloti en otras especies de Rhizobium y Bradyrhizo-

bium, siendo su localización en todos los casos cromosómica, y encontrándose en algunos de ellos reiteraciones (Coronado y col., 1989).

Aunque estimulan la división meristemática y a menudo provocan la curvatura de los pelos radicales, los mutantes afectados en la producción de EPS (Finan y col., 1985; Leigh y col., 1985; Müller y col., 1988), LPS (Noel y col., 1986; Carlson y col., 1986) o B-1,2-glucanos (Dylan y col., 1986) presentan un fenotipo bastante común, que se caracteriza por la formación de nódulos pequeños, en los que no se han formado cordones de infección (Finan y col., 1985; Leigh y col., 1985; Dylan y col., 1986; Finan y col., 1986; Hynes y col., 1986) o bien éstos abortaron (Carlson, 1987; Cava y col., 1989), ni se encuentran bacteroides (nódulos vacíos) y que, por tanto, no fijan nitrógeno.

A pesar de que la evidencia genética de la intervención de dichos polisacáridos en la simbiosis es muy grande, en este campo los estudios han revelado de nuevo la complejidad del sistema; aparentemente, los polisacáridos de superficie, aunque no requeridos por las bacterias para la formación del nódulo, parecen serlo al menos en los primeros estadios de la simbiosis, la invasión de la planta hospedadora, interviniendo al parecer en la iniciación del cordón de infección y/o en el crecimiento de la bacteria en el cordón de infección.

Es interesante destacar que, aunque la ausencia de EPS

generalmente origina nódulos vacíos, el rango de hospedador de la bacteria mutada a menudo permanece invariable (Finan y col., 1985). En tales casos, los polisacáridos no intervienen en la especificidad de hospedador; sin embargo en otros, y dependiendo de la leguminosa hospedadora, sí parece existir una estrecha relación entre la producción de EPS y capacidad para nodular una planta determinada (Chen y col., 1985; Borthakur y col., 1986), sugiriendo que una parte de la especificidad está mediada por polisacáridos de superficie y ocurre a nivel del cordón de infección.

Como más adelante veremos, la especificidad de hospedador es un fenómeno muy complejo que no ocurre a un único nivel, sino que parece como si la bacteria, a medida que invade a la planta, fuera abriendo una llave tras otra, descifrando, incluso ya dentro del nódulo, las claves que su simbionte le presenta. Así, ya en las primeras etapas se admite la interacción específica entre exudados de la planta (compuestos quimioatrayentes y/o inductores o represores de los genes nod) y las bacterias, y entre los polisacáridos de superficie bacterianos y las lectinas; por otro lado, la formación del cordón de infección nos ofrece otro ejemplo de posible interacción específica.

Además de éstos, se han atribuido otros papeles a los polisacáridos de superficie de "Rhizobium". Puede ser que los exopolisacáridos en algunas especies y los lipopolisacáridos en otras sean procesados enzimáticamente y actúen como moléculas señales dirigidas a la planta (Leigh y col., 1987; Sig-

ner y col., 1988); también se ha postulado que los EPS (Djorjevic y col., 1987) y los LPS (Jones y col., 1987) previenen a la bacteria de una reacción de defensa de la planta; no olvidemos a este respecto que los primeros estadios de la interacción tienen más de patogénicos que de mutualistas; por último, el α -glucano cíclico ha sido involucrado en la adaptación osmótica durante la invasión (Miller y col., 1986b; Dylan y col., 1990).

5.4.- Genes requeridos para la fijación de nitrógeno en el nódulo maduro

Los genes requeridos en los estadios finales de la simbiosis se identifican fundamentalmente porque mutaciones en ellos incapacitan a las bacterias para fijar nitrógeno, y por lo tanto, los nódulos son Fix⁻ (Beringer y col., 1980). Cuando la ausencia de fijación de nitrógeno se debe a un fallo en el desarrollo del nódulo tal como un defecto en la invasión, el fenotipo se describe como Ndv⁻ (Noel y col., 1986); el fenotipo Fix⁻ se relaciona más particularmente con la diferenciación de las bacterias en bacteroides y las funciones de fijación de nitrógeno e intercambio con el citoplasma de la planta hospedadora (Long y col., 1989).

5.4.1.- Genes de fijación de nitrógeno (nif, fix)

Los genes que funcionan específicamente en la fijación de nitrógeno se designan de dos formas: aquellos que son ho-

mólogos a los genes nif de Klebsiella pneumoniae son designados con los mismos nombres, el resto son denominados fix. De los 17 genes nif identificados en Klebsiella, al menos 8 se han descrito en varias especies de "Rhizobium" (ver Gussin y col., 1986; Hennecke y col., 1988, para revisión);

Los primeros en ser estudiados fueron los que codifican la síntesis de la enzima nitrogenasa, nifHDK, que se han encontrado en todas las especies estudiadas (ver Martínez y col., 1990 para revisión), aunque su organización varía de unas a otras, encontrándose reiterados en algunas estirpes de la biovariedad phaseoli de R. leguminosarum (Quinto y col., 1982), Rhizobium sp. NGR234 (Morrison y col., 1983), S. fredii (Prakash y Atherly, 1984) y A. caulinodans (Norel y col., 1985).

Otros genes nif descritos en R. meliloti, R. leguminosarum y B. japonicum son nifN, nifE y nifB, que participan en la síntesis del cofactor FeMoco requerido para la actividad del componente I de la nitrogenasa. Esta enzima opera con un gran gasto energético (necesita 28 moles de ATP para reducir un mol de nitrógeno) y es oxigenolábil (ver Long, 1989 para revisión).

También se han identificado numerosos genes fix, pero las funciones bioquímicas de la mayoría de ellos permanecen por esclarecer; algunos guardan semejanzas con ferredoxinas bacterianas u otras proteínas que se unen a metales, habiéndose propuesto que estos genes codifican componentes especializados para la transferencia de electrones durante la

simbiosis. (Earl y col., 1987; Ebeling y col., 1988; Hennecke y col., 1988; Iismaa y Watson, 1987).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno típicamente regulan la expresión de los genes nif en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno y a la tensión de oxígeno. De los genes reguladores, nifA juega un papel muy importante en el proceso, habiéndose encontrado que su producto activa la transcripción de los promotores nifHDK, nifB, nifN y otros promotores fix (Szeto y col., 1984; Weber y col., 1985; Aguilar y col., 1987; Buikema y col., 1987); a su vez, la expresión del gen nifA se induce cuando la concentración de oxígeno es reducida a condiciones de microaerofilia (Ditta y col., 1987) y en R. meliloti este efecto es mediado por dos genes, fixL y fixJ (David y col., 1988; Virts y col., 1988).

5.4.2.- Genes para el metabolismo de los bacteroides

Los bacteroides son formas de la bacteria que están adaptadas a un estilo de vida simbiótico; por ello, genes que no son esenciales en vida libre pueden serlo en simbiosis para el metabolismo de los bacteroides en el nódulo, o requeridos para lograr una mayor efectividad de la fijación de nitrógeno; muchos de los genes fix aún no caracterizados pertenecen probablemente a este tipo. De particular interés son tres grupos de genes, a saber, los requeridos para el transporte de ácidos dicarboxílicos (dot), los que codifican la biosíntesis del grupo hemo (hem) y los genes de la enzima

hidrogenasa (hup), respectivamente.

Genes dct

Los ácidos dicarboxílicos del tipo fumárico, málico o succínico se consideran como las más probables fuentes de carbono y energía proporcionadas por la planta (fotosintatos) y utilizados por los bacteroides en los nódulos. Esto se fundamenta en parte por el hecho de que la enzima encargada de su síntesis, la fosfoenol piruvato carboxilasa, es sintetizada en el nódulo en cantidades muy superiores al resto de la raíz; el transporte de dichos ácidos al interior de los bacteroides está muy desarrollado y los genes bacterianos que codifican la síntesis de las enzimas requeridas para este transporte (dct) parecen ser necesarios para el éxito de la fijación, ya que mutantes de "Rhizobium" en dichos genes dan lugar a un fenotipo Fix⁻ (Ronson y col., 1981; Engelke y col., 1987; Watson y col., 1988).

Genes hem

Durante la fijación de nitrógeno, la baja concentración de oxígeno requerida para la actividad nitrogenasa es mantenida por la leghemoglobina, la cual da a los nódulos un color rosado característico. El cofactor hemo es producido por la bacteria, habiéndose clonado, en el caso de R. meliloti, el gen hemA, que se transcribe tanto en vida libre como en

simbiosis y codifica la enzima delta aminolevulinico sintetasa, primera de la vía de síntesis del grupo hemo (Leong y col., 1982; Leong y col., 1985).

Los mutantes hemA de R. meliloti fueron Fix⁻, indicando que este gen es necesario para la producción de una leghemoglobina funcional (Leong y col., 1985).

Genes hup

Durante la reacción de reducción de nitrógeno catalizada por la nitrogenasa se pierden grandes cantidades de energía en forma de hidrógeno (H₂); algunas estirpes de R. leguminosarum bv. viciae y de B. japonicum poseen un complejo enzimático independiente, cuyo primer componente es la hidrogenasa, (sistema Hup) que recicla el hidrógeno oxidándolo de nuevo a protones, ganando poder reductor y salvando parte de la energía que de otra forma se perdería en el aire (Dixon, 1968); esto supone una mejora en la eficiencia de la fijación de nitrógeno, que se traduce en un aumento del rendimiento de las cosechas de leguminosas (Schüber y Evans, 1976).

Los genes hup de B. japonicum están localizados en el cromosoma y fueron clonados por complementación de un mutante Hup⁻ (Cantrell y col., 1983); por el contrario, los de R. leguminosarum bv. viciae son plasmídicos (Brewin y col., 1980) y fueron aislados por el método de hibridación de colonias, usando como sondas los genes hup de B. japonicum previamente clonados (Leyva y col., 1987, 1990).

La transferencia de plásmidos con los genes hup de R. leguminosarum bv. viciae a R. meliloti condujo a la detección de actividad hidrogenasa en los nódulos inducidos por la cepa receptora en alfalfa (Bedmar y col., 1984; Behki y col., 1985), si bien esto no resultó en un incremento de la biomasa o del contenido en nitrógeno de las plantas noduladas (Behki y col., 1985).

6.- LOCALIZACION DE LOS GENES SIMBIOTICOS, LOS PLASMIDOS SYM

En la especies de Rhizobium y Sinorhizobium, la mayoría de los genes necesarios para la nodulación y fijación de nitrógeno se localizan en un plásmido, denominado por ello plásmido simbiótico o pSym (Johnston y col., 1978; Beynon y col., 1980; Banfalvi y col., 1981; Hombrecher y col., 1981; Hooykaas y col., 1981); otros "loci" simbióticos se mapearon en el cromosoma (Noel y col., 1984; Dylan y col., 1986) o en otros plásmidos (Finan y col., 1986; Toro y Olivares, 1986; Martínez y col., 1987).

En Bradyrhizobium y Azorhizobium, los genes simbióticos hasta ahora descritos no están aparentemente localizados en plásmidos, por lo que se supone que son cromosómicos (Haugland y Verma, 1981; Masterson y col., 1982; Van den Eede y col., 1987).

La Tabla III resume la localización de los genes simbióticos descritos.

Los plásmidos Sym

Durante mucho tiempo, el estudio de la fijación biológica de nitrógeno estuvo limitada a los plásmidos de "Rhizobium". La presencia de grandes plásmidos es una característica de las rizobiáceas, variando su número y tamaño no sólo según la especie, sino también en las distintas estirpes dentro de la misma especie (Prakash y Atherly, 1986); por ejemplo, en el caso de las biovariedades de R. leguminosarum nos encontramos plásmidos de un peso molecular que oscila entre 100 y 450 kb mientras que R. meliloti generalmente posee dos plásmidos de mucho mayor tamaño, denominados por ello megaplásmidos, cuyos pesos moleculares estimados por microscopía electrónica están en el rango de 1000 a 1500 kb (Burkardt y col., 1987). Sin embargo, en algunas cepas de Bradyrhizobium no se ha podido detectar ADN extracromosómico (Haugland y Verma, 1981; Masterson y col., 1985).

Generalmente, el número de plásmidos suele variar de uno a seis, pudiendo representar hasta el 25% del genoma total de "Rhizobium", lo que hizo suponer muy tempranamente que parte de los genes simbióticos podrían estar localizados en ellos (Higashi, 1967). Aunque fueron Johnston y col. (1978) los que primero realizaron la transferencia de un plásmido con funciones simbióticas, la evidencia física de la presencia de genes nif en un plásmido fue obtenida por primera vez cuando un plásmido de la bv. viciae de R. leguminosarum hibridó

frente a los genes nif de Klebsiella pneumoniae (Nutti y col., 1979). Hooykaas y col. (1981) fueron los primeros que propusieron el término plásmido Sym -de "sym(biosis)"- para un plásmido de R. leguminosarum bv. trifolii que confirió a la bv. viciae la capacidad de nodular trébol, demostrándose que éste no sólo controlaba la especificidad de hospedador sino también otras etapas que conducen a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

Los plásmidos Sym pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad, por lo que es genéticamente posible introducir dos pSym en una misma cepa, habiéndose realizado numerosos experimentos de transferencia de plásmidos simbióticos entre rizobiáceas.

La transferencia de plásmidos Sym a mutantes simbióticos de la misma especie normalmente conduce a la restauración de las funciones simbióticas normales (Johnston y col., 1978; Brewin y col., 1980; Hooykaas y col., 1981; Kondorosi y col., 1982).

El resultado de experimentos de transferencia en los que un plásmido simbiótico es conjugado a una estirpe de diferente especificidad es sin embargo más difícil de predecir. En algunos casos, la transferencia de un pSym amplía el rango de hospedador de la cepa receptora (Johnston y col., 1978; Brewin y col., 1980; Hooykaas y col., 1981; Lamb y col., 1982; Djordjevic y col., 1983; Appelbaum y col., 1985); en otros, conduce a la formación de nódulos, pero éstos son inefectivos (Fix-) (Kondorosi y col., 1982; Djordjevic y col., 1983;

Appelbaum y col., 1985); más aún, otros resultados sugieren una cierta "incompatibilidad funcional" entre plásmidos simbióticos, por ejemplo, estirpes de R. leguminosarum bv. phaseoli que albergan un plásmido de la bv. viciae, en algunos casos son capaces de nodular guisante solamente si el plásmido que lleva el rango de hospedador de la bv. phaseoli se pierde o modifica (Beynon y col., 1980), en otro ejemplo, Djordjevic y col. (1983) y Rolfe y col. (1983) encontraron que cuando los plásmidos pJB5JI o pBRIAN (que codifican especificidad para guisante y trébol, respectivamente) eran transferidos a varias estirpes de R. meliloti curadas del pSym, éstas no fueron capaces de nodular guisante o trébol, respectivamente.

La transferencia de plásmidos simbióticos a estirpes de A. tumefaciens proporcionan otra importante clase de transconjugantes, cuyas propiedades varían en función de la cepa de "Rhizobium" donadora. En algunos casos se forman pseudonódulos en la planta hospedadora de la estirpe parental (Kondrosi y col., 1982; Truchet y col., 1984); en otros, se induce la formación de nódulos que son Fix⁻ (Hooykaas y col., 1981, 1982); por último, se ha descrito que los plásmidos simbióticos de determinadas estirpes de R. leguminosarum bv. phaseoli (como CFN299 y CIAT899) confieren a A. tumefaciens la capacidad de formar nódulos fijadores en las plantas hospedadoras de estas estirpes (Martínez y col., 1987; Brom y col., 1988); esta capacidad no es una característica general de todos los representantes de R. leguminosarum bv. phaseoli, puesto que

los plásmidos Sym de otras estirpes de la biovariedad pueden conferir a A. tumefaciens la capacidad de inducir nodulación, pero no fijación (Brom y col., 1988).

7.- GENES TEMPRANOS DE NODULACION (GENES nod)

Las funciones fisiológicas de los genes nod se han asociado con las etapas reconocibles al microscopio durante la formación de los nódulos, y se han determinado observando las diferencias entre las estirpes silvestres y los mutantes en los genes correspondientes. Los genes de nodulación se han caracterizado por mutagénesis y secuencia nucleotídica, y a pesar de que en la mayoría de los casos se conocen las proteínas que codifican, realmente se sabe muy poco sobre la manera en que estas actúan a nivel fisiológico; en este sentido, la bioquímica tendrá que aportar mucho al conocimiento del proceso de nodulación.

Una característica prácticamente general de los genes nod es que se localizan en regiones de ADN relativamente cortas, bien en el plásmido Sym, bien en el cromosoma, y normalmente muy cercanos a los genes nif y otros genes fix; este agrupamiento, que se demuestra por el hecho de que la transferencia de pequeños fragmentos de ADN a una estirpe curada es suficiente para inducir nodulación (Downie y col., 1983; Schofield y col., 1984) es la causa de que sea muy frecuente hablar de regiones nod-nif, siendo de 32 kb la región nod-nif completa más pequeña encontrada, que es la única capaz de conferir capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno a un derivado curado (Innes y col., 1988).

7.1.- Genes nod conocidos, estructura de los operones nod, proteínas Nod

La Figura 5 muestra, no a escala, la organización de las regiones nod-nif de las especies más estudiadas. Como se puede observar, la mayoría de las definiciones de genes provienen del estudio de R. meliloti, B. japonicum y de las bio-variedades viciae y trifolii de R. leguminosarum. Como veremos más adelante, a excepción del gen nodD, los genes nod no se expresan constitutivamente, y necesitan ser inducidos por el producto de nodD junto con exudados de la planta.

A continuación describiremos los principales genes nod descritos hasta el momento, que se resumen en la tabla IV; sin embargo, los análisis genéticos de mutagénesis y complementación apuntan hacia la existencia de más genes, que probablemente serán caracterizados en un futuro próximo.

7.1.1.- Genes nod "comunes"

Se llaman así porque pueden ser reemplazados por los correspondiente genes de otras especies de "Rhizobium" sin que se afecte el rango de hospedador (Kondorosi y col., 1984).

Genes nodABC

Los genes nodABC, encontrados prácticamente en todas la especies estudiadas (Tabla V), están muy conservados, tanto

funcionalmente como a nivel de secuencia nucleotídica (Rossen y col., 1984; Török y col., 1984; Egelhoff y col., 1985; Fisher y col., 1985; Jacobs y col., 1985; Rodríguez-Quiñones y col., 1987).

Estos genes están implicados en la deformación (fenotipo Had) y curvatura (fenotipo Hac) de los pelos radicales, así como en la inducción meristemática en el córtex; por ello, las mutaciones en los genes nodABC resultan en una completa abolición de la nodulación (fenotipo Nod⁻) (Kondorosi y col., 1984; Török y col., 1984; Rossen y col., 1984; Djordjevic y col., 1985; Downie y col., 1985; Egelhoff y col., 1985; Jacobs y col., 1985; Debelle y col., 1986). Por otro lado, los genes nodABC son los responsables de la producción de raíces cortas y gruesas en algunas leguminosas (fenotipo Tsr) (Zaat y col., 1987), y, por último, en *R. meliloti* son requeridos para la quimiotaxis hacia la luteolina (Caetano-Anollés y col., 1989 y ver Introducción 5.1).

Las secuencias nucleotídicas de los genes nodA y nodB no revelan similitud con otros genes que pudiera indicar algo sobre la naturaleza de sus proteínas (Rossen y col., 1984; Török y col., 1984; Egelhoff y col., 1985). Dichas proteínas, NodA y NodB, de pesos moleculares 21,8 y 23,8 kDa, respectivamente, han sido localizadas en el citoplasma de las células (Schmidt y col., 1986; Schmidt y col., 1988) y están implicadas en la síntesis de un factor soluble, termoestable, de bajo peso molecular, de naturaleza química desconocida, que se excreta al medio de cultivo y que estimula la mitosis de

protoplastos de células vegetales en cultivo (Schmidt y col., 1988).

NodC es una proteína de 46,8 kDa localizada en la superficie y anclada en la membrana de *R. meliloti*, cuya estructura, que comprende una corta región intracelular (extremo carboxilo terminal), un dominio de anclaje a través de la membrana próximo al extremo carboxilo terminal y un fragmento extracelular grande, es similar a la de receptores de la superficie celular de eucariotas (John y col., 1985, 1988).

Esta proteína, que probablemente existe en la membrana como un dímero (John y col., 1988), no parece estar relacionada con la síntesis del factor producido por las proteínas NodA y NodB (Schmidt y col., 1988); sin embargo, puesto que las mutaciones en nodC impiden la curvatura de los pelos radicales, el factor producido por nodAB no es suficiente por si mismo para inducir la curvatura y aparentemente se requiere también la actuación del gen nodC.

A pesar de que los genes nodABC se expresan durante los inicios del proceso de nodulación, se ha detectado una forma truncada de la proteína NodC en nódulos maduros de varias leguminosas, cuya cantidad aumenta durante el desarrollo del nódulo, lo que sugiere que NodC juega un papel importante y general durante este desarrollo (John y col., 1988).

El hecho de que los genes nodABC estén implicados tanto en la curvatura del pelo radical como en la inducción meristemática, en la aparición del fenotipo Tsr y en una de las vías de quimiotaxis de *R. meliloti*, hace suponer que el

operón nodABC gobierna simultáneamente todos estos fenotipos, debiendo existir antecedentes comunes para los cuatro eventos.

Por otro lado, recientes estudios han demostrado que clones de alfalfa pueden formar nódulos radicales (no fijadores) en ausencia de R. meliloti, lo que indica que la planta hospedadora posee el programa genético completo para la organogénesis del nódulo, y que el papel del microsimbionte es activar ese programa (Truchet y col., 1989). En este sentido, un nuevo descubrimiento ha dado algo de luz a esta complicada cuestión, la determinación de la estructura de una molécula sintetizada por R. meliloti, NodRm-1, que podría ser la señal que ponga en marcha los mecanismos de la planta que desencadenan la nodulación. La estructura de NodRm-1 es nueva: es un α -1,4-tetrasacárido de D-glucosamina (PM 1,102 kDa), con grupos N-acetilo en tres de los azúcares, que además lleva en una de sus unidades, la del extremo reductor, un grupo sulfato en el carbono 6, y por último, el azúcar del extremo no reductor tiene en su carbono 2 un radical N-acetilo sustituido con un ácido graso bis-insaturado de 16 átomos de carbono (Lerouge y col., 1990). NodRm-1 indujo la deformación de los pelos radicales (fenotipo Had) específicamente en su hospedador, la alfalfa, pero no en otras plantas como el guisante (Lerouge y col., 1990). La producción de esta señal extracelular, específica para la alfalfa, requiere, además de la inducción por exudados de la planta, la expresión de al menos los genes nodABC y, probablemente, la de otros genes de

R. meliloti implicados en la producción de señales extracelulares específicas, tales como nodH (ver). El conocimiento de NodRm-1 abre un nuevo camino, ya que ahora se podrá investigar en otros "Rhizobium" la presencia de moléculas estructuralmente relacionadas con ésta, y puesto que nodABC son genes comunes, es probable que las moléculas señales de distintos "Rhizobium" tengan características comunes, siendo modificadas o procesadas en cada especie por los genes nod "específicos".

Queda además por esclarecer si NodRm-1 es la responsable del resto de los fenotipos asignados al operón nodABC, pudiendo ser éstos efectos directos de NodRm-1 o, alternatively, la molécula podría traducirse en una señal secundaria. Puesto que se ha demostrado que la nodulación está relacionada con la alteración del balance hormonal de la planta, entre los posibles candidatos para ser señales secundarias están hormonas vegetales tales como auxinas, giberelinas o citoquininas; así, se han inducido pseudonódulos en alfalfa mediante el tratamiento con inhibidores del transporte de auxinas (Hirsch y col., 1989), de modo semejante a los pseudonódulos formados por el tratamiento con citoquininas (Rodríguez-Barrueco y de Castro, 1974; Long y Cooper, 1988).

Por último, el hecho de que NodRm-1 sea un oligosacárido modificado es muy interesante, ya que posee las características estructurales de los ligandos de las lectinas, y dado el papel que se ha asignado a éstas en el reconocimiento específico durante la simbiosis (Díaz y col., 1989).

Genes nodIJ

En R. leguminosarum bvs. viciae (Evans y Downie, 1986) y trifolii (región II) (Djordjevic y col., 1985; Innes y col., 1985; Surin y col., 1990), R. meliloti (Long, 1989) y B. japonicum (Niewkoop y col., 1987; Hennecke y col., 1988), en el mismo operón que nodAB se localizan otros dos genes, nodI y nodJ.

Las secuencias nucleotídicas de los genes nodIJ (Evans y Downie, 1986; Surin y col., 1990) predicen para sus productos homología con una familia de pares de proteínas implicadas en el transporte activo; NodI es una ATPasa asociada a la membrana citoplasmática y NodJ, muy hidrofóbica, una proteína integral de membrana (Evans y Downie, 1986). Se desconoce la molécula que puedan transportar dichas proteínas, si bien no debe ser esencial para la formación del nódulo (o alternativamente existe otro sistema de transporte sustitutivo), ya que las mutaciones en estos genes no tienen efecto en B. japonicum (Niewkoop y col., 1987; Hennecke y col., 1988), y en R. leguminosarum bv. viciae resultan en un ligero retraso en la nodulación de algunos hospedadores (Evans y Downie, 1986); sin embargo, la nodulación del trébol por mutantes en nodIJ parece estar afectada más severamente (Djordjevic y col., 1985; Huang y col., 1988).

7.1.2.- Genes nod "específicos"

Estos genes se han asociado con la nodulación específica de determinadas plantas hospedadoras, ya que, a pesar de que a veces existe homología en la secuencia nucleotídica, sus mutaciones no se complementan con genes de otras especies de "Rhizobium" (Kondorosi y col., 1984). Además de estar implicados en la determinación del rango de hospedaodr, a veces influyen en la eficiencia de nodulación.

Genes nodFE

Los genes nodF y nodE, necesarios para la formación del cordón de infección, se han descrito en R. meliloti (también llamados h_{sn}AB) (Debellé y Sharma, 1986; Horvath y col., 1986) y en R. leguminosarum bvs. viciae (Shearman y col., 1986) y trifolii (región III) (Djordjevic y col., 1985; Schofield y Watson, 1986). Curiosamente, aunque existe una extensa homología entre las secuencias de los genes nodFE de distintas especies de Rhizobium, dichos genes no son funcionalmente equivalentes.

Al hablar del efecto de las mutaciones en los genes nodFE, hay que diferenciar entre el hospedador específico y el heterólogo. En el hospedador específico, las mutaciones en los genes nodFE dan lugar a una curvatura excesiva de los pelos radicales y afectan al desarrollo del cordón de infec-

ción, produciéndose un retraso en la nodulación (Debellé y col., 1986; Horvath y col., 1986); sin embargo, cuando estos mutantes se inoculan en otros hospedadores, se produce un fenotipo muy diferente, así, los mutantes en nodF y nodE de R. leguminosarum bv. trifolii son capaces de nodular guisantes, aunque peor que R. leguminosarum bv. viciae silvestre (Djordjevic y col., 1985); en otro ejemplo, los mutantes en nodF y nodE de R. meliloti son capaces de producir la curvatura del pelo radical del trébol, cosa que no ocurre con R. meliloti silvestre (Debellé y col., 1986).

Mientras que la transferencia de los genes nodFE de R. leguminosarum bv. viciae a la bv. trifolii capacita a esta última para nodular Vicia hirsuta (Surin y Downie, 1989), en el experimento inverso, en el que los genes nodFE de R. leguminosarum bv. trifolii se introducen en R. leguminosarum bv. viciae, los transconjugantes son incapaces de nodular el trébol blanco (Surin y Downie, 1989). Por otra parte, cuando los genes nodFEGH de R. meliloti se introducen en R. leguminosarum bv. trifolii impiden que éste nodule el trébol, su hospedador habitual (Debellé y col., 1988).

Resumiendo, de las observaciones del comportamiento de los mutantes en nodFE y de los experimentos de transferencia de estos genes a otras especies se deduce que estos genes posiblemente ejercen un control negativo de la especificidad en el hospedador heterólogo (Debellé y col., 1986).

Mediante una serie de experimentos de transferencia de regiones nod entre R. leguminosarum bv. viciae y R. legumi-

nosarum bv. trifolii, Surin y Downie (1989) dedujeron que el gen nodE juega un papel clave en el reconocimiento de las plantas hospedadoras de las dos biovariedades, sugiriendo que la expresión de nodE de R. leguminosarum bv. viciae podría antagonizar la nodulación del trébol por la bv. trifolii o, de forma inversa, el gen nodE de la bv. trifolii antagoniza la nodulación del guisante por R. leguminosarum bv. viciae.

Por otro lado, separando los genes nodE de las bvs. viciae y trifolii de sus respectivos genes nodF (con lo que ahora son expresados bajo el control del promotor nodABCIJ), Spaink y col. (1989) demostraron que el producto del gen nodE es el principal factor que distingue el rango de hospedador de R. leguminosarum bv. viciae y R. leguminosarum bv. trifolii; además, la construcción de genes nodE híbridos, que consistieron en el extremo 5' de nodE de R. leguminosarum bv. viciae y el extremo 3' de nodE de R. leguminosarum bv. trifolii, estos mismos autores demostraron que una región central de 188 aminoácidos, que contiene un dominio de solamente 44 aminoácidos conservados entre los dos genes, determina las diferencias en la especificidad de hospedador de las dos proteínas NodE.

Usando anticuerpos, se ha demostrado la localización de la proteína NodE (42kDa) en la membrana citoplasmática (Spaink y col., 1989), sugiriendose que es una proteína transmembrana, con regiones presentes en los compartimentos citoplasmático y periplásmico, y que la reacción de especificidad hacia la planta probablemente sea debida a un producto

que específicamente produce, modifica o transporta la proteína NodE (Spaink y col., 1989).

La proteína NodE es homóloga a la β -cetoacil sintetasa de *E. coli*, enzima condensadora que está implicada en la biosíntesis de ácidos grasos, y también es homóloga a algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de antibióticos poliketidos en *Streptomyces* (Bibb y col., 1989; Shearman y col., 1989), antibióticos que son sintetizados a través de una vía que implica la actuación de varios productos de genes (quizás formando un complejo multienzimático), que incluye una proteína transportadora de grupos acilos y una β -cetoacil sintetasa (Bibb y col., 1989; Shearman y col., 1989).

La proteína NodF posee un peso molecular de 9,76 kDa y es homóloga a proteínas transportadoras de grupos acilo (Debellé y Sharma, 1986; Shearman y col., 1986); esta proteína es muy hidrofílica, por lo que se ha sugerido que podría localizarse en el citoplasma (Spaink y col., 1989). También se ha sugerido que la proteína NodF funciona en "*Rhizobium*" en reacciones de transferencia de grupos acilo, por ejemplo, en biosíntesis de ácidos grasos, exopolisacáridos o lipopolisacáridos (Shearman y col., 1986); sin embargo, y puesto que la delección de *nodF* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* no afecta a su crecimiento, parece que este gen no es esencial para la biosíntesis de ácidos grasos, aunque sí podría jugar un papel en la biosíntesis del EPS o LPS (Downie, 1986); por ejemplo, se ha postulado que cuando el gen *nodF* es activado, modifica la estructura de un polisacárido de superficie y la bacteria,

con su nueva cubierta, es entonces reconocida, presumiblemente por una lectina específica de la raíz de la planta ().

Por otro lado, en E. coli, las enzimas transportadoras de grupos acilo funcionan como transglucosilasas en la síntesis de α -1,2-glucanos (Therisod y col., 1986; Therisod y Kennedy, 1987), parecidos a los α -glucanos cíclicos encontrados en las rizobiáceas, que han sido implicados en el proceso de nodulación (ver); aunque la producción de α -glucanos cíclicos en R. meliloti no requiere la inducción de los genes nod sino la de los genes, ndvA y ndvB (stanfield y col., 1988), se ha postulado que nodF y nodE podrían estar implicados en la producción, modificación o transporte de un α -glucano específico no identificado todavía. Además, el importante papel de la lectinas en el reconocimiento que se unen específicamente a azúcares (Diaz y col., 1989) también indica que la proteína NodE está implicada en la producción de una señal específica de naturaleza carbohidrato. La localización de los genes nodF y nodE en el mismo operón sugiere que las dos proteínas están implicadas en el mismo proceso.

Genes nodGH

Caracterizados en R. meliloti (Debellé y Sharma, 1986; Rostas y col., 1986; Fisher y Long, 1987), estos genes no se han encontrado en R. leguminosarum ni B. japonicum (Rodri-

quez-Quiñones y col., 1987), aunque si parecen existir secuencias homólogas a nodH (hsnD) en Sinorhizobium fredii y en Rhizobium sp. MPIK3030 (Rodríguez-Quiñones y col., 1987).

El gen nodG codifica una proteína de 26 kDa, que es homóloga a varias deshidrogenasas, tales como ribitol deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y gliceraldehído-3P deshidrogenasa (Debellé y Sharma, 1986; Rostas y col., 1986; Fisher y Long, 1987). Sus mutaciones dan lugar a un pequeño retraso en la nodulación de la alfalfa, la planta hospedadora de R. meliloti (Horvath y col., 1986) y Debellé y Sharma (1986) han postulado que la proteína NodG podría servir a la bacteria para utilizar algún compuesto vegetal como fuente de energía durante la infección.

El gen nodH parece ser un gen específico de R. meliloti, siendo necesario, además de los genes nodABC, para producir la curvatura del pelo radical de la alfalfa (Debellé y Sharma, 1986; Rostas y col., 1986; Fisher y Long, 1987). La secuencia nucleotídica de nodH revela una proteína de 28,5 kDa, no similar a ninguna descrita, que posee cuatro residuos de prolina contiguos, lo cual es excepcional en proteínas procariotas. En plantas, proteínas ricas en prolina son sintetizadas como parte de mecanismos de defensa, y en Chlamydomonas reinhardtii, una proteína rica en hidroxiprolina está implicada en interacciones celulares altamente específicas (Cooper y col., 1983).

En R. meliloti, la proteína NodH está implicada en la modificación del factor producido por los genes nodABC,

transformándolo en una señal extracelular capaz de producir específicamente la curvatura del pelo radical de la alfalfa (Faucher y col., 1988; Banfalvi y col., 1989); es por esto que los mutantes en nodH de R. meliloti producen la total inhibición de la nodulación de la alfalfa, pero estos mutantes son capaces de inducir la curvatura del pelo radical del trébol (Horvath y col., 1986).

Genes nodLMN

Contrariamente a los genes nodGH, que parecen ser prácticamente exclusivos de R. meliloti (Rodríguez-Quiñones y col., 1987), los genes nodLMN se han encontrado únicamente en R. leguminosarum, habiéndose caracterizado en la bv. viciae (Surin y Downie, 1988; Canter-Cremers y col., 1989) y hallado secuencias homólogas en la bv. trifolii (Surin y Downie, 1988; Rodríguez-Quiñones y col., 1989), pero no en R. meliloti ni B. japonicum (Rodríguez-Quiñones y col., 1987).

En R. leguminosarum bv. viciae, nodL está en el mismo operón que nodFE, y los genes nodNM se localizan en otro operón (Surin y Downie, 1988; Canter-Cremers y col., 1989). El gen nodL está relacionado con la especificidad de hospedador, puesto que mutaciones en este gen tienen un efecto importante en la nodulación del guisante (drástica reducción en el número de nódulos), pero tienen un efecto muy pequeño en la nodulación de Vicia hirsuta (Surin y Downie, 1988); sin embargo, las mutaciones en nodN o nodM prácticamente no tienen efecto

en la nodulación de las plantas de Vicia o guisante (Surin y Downie, 1988; Canter-Cremers y col., 1989).

Las secuencias nucleotídicas de los tres genes revelaron las proteínas NodL(20,1 kDa) (Surin y Downie, 1988; Canter-Cremers y col., 1989), NodM (65,8 kDa) (Surin y Downie, 1988) y NodN (18 kDa) (Surin y Downie, 1988).

La proteína NodN no parece homóloga a otras proteínas conocidas (Surin y Downie, 1988), mientras que la secuencia nucleotídica de NodM muestra homología con enzimas amidofosforibosil-transferasas, habiéndose postulado que el producto del gen nodM está implicado en la transferencia de grupos amido, posiblemente a la parte azucarada del LPS o EPS (Surin y Downie, 1988).

La secuencia del gen nodL predice una proteína integral de membrana (Canter-Cremers y col., 1989) homóloga a dos acetil transferas de E. coli: lacA y cysE (Downie, 1989), por lo que parece probable que nodL esté implicado en la acetilación de algún azúcar (Downie, 1989); en este sentido es significativo que nodFEL, que se localizan en el mismo operón, tengan homología con enzimas implicadas en el metabolismo del acetato via acetil CoA.

Funcionalmente, nodL parece jugar un papel en la estabilización del cordón de infección y en la regulación de la curvatura de los pelos radicales, ya que los mutantes en nodL causan excesiva curvatura de los pelos radicales (Canter-Cremers y col., 1989), fenómeno que también ha sido descrito para los mutantes en los genes nodFE (Debellé y col., 1986).

Por otro lado, parece que nodL es funcionalmente intercambiable ("común") entre las biovariedades trifolii y viciae de R. leguminosarum (Canter-Cremers y col., 1989; Rodríguez-Quiñones y col., 1989).

Genes nodPQ

Los genes nodP y nodQ de R. meliloti han sido secuenciados recientemente, y codifican dos proteínas de 34,7 y 70,5 kDa, respectivamente (Cervantes y col., 1989; Schwedock y col., 1989); ambos genes parecen estar presentes en más de una copia en el genoma de R. meliloti, habiéndose localizado secuencias homólogas a nodP y nodQ en otras especies de Rhizobium, y a nodP en E. coli y en Azospirillum brasilense (Schwedock y col., 1989).

Los mutantes en nodP y nodQ de R. meliloti no parecen tener efecto en la nodulación de alfalfa, sin embargo esto puede ser debido a la presencia de copias extras de estos genes en R. meliloti, por lo que para observar el fenotipo se necesitaría mutar todas las copias.

El gen nodQ codifica una proteína homóloga a factores de iniciación y elongación de la translación en la síntesis de proteínas (Cervantes y col., 1989; Schwedock y col., 1989); sin embargo, los mutantes en nodQ sólo resultan en un ligero retraso en la nodulación, por lo que dicha proteína no debe ser necesaria como tal factor, o, alternativamente, puede ser sustituida por otra de las copias intactas.

Con respecto a la función, los genes nodP y nodQ parecen estar relacionados de alguna manera con la determinación de la especificidad de hospedador, siendo necesarios para conferir a R. leguminosarum bv. trifolii la capacidad de curvar los pelos radicales de la alfalfa, y puesto que una mutación en estos genes extiende el rango de infección de R. meliloti para nodular Vicia sativa nigra, Cervantes y col. (1989) sugirieron que, así como los genes nodFE y nodH, los genes nodP y nodQ determinan la especificidad de hospedador en el sentido de que previenen la curvatura del pelo radical y la formación de cordones de infección en el hospedador heterólogo Vicia sativa nigra.

El gen nodO

Descrito en R. leguminosarum bv. viciae (De Maagd y col., 1989; Economou y col., 1989), el gen nodO (también denominado nodR) es el gen estructural de la proteína NodO (30 kDa), primera proteína descrita en R. leguminosarum bv. viciae que se secreta al medio de cultivo.

La secuencia de este gen ha revelado una cierta similitud con el extremo amino de la proteína hemolisina HlyA de E. coli y con otras proteínas de bacterias que se excretan de la misma manera (De Maagd y col., 1989; Economou y col., 1989). Economou y col. (1989) demostraron que NodO es una proteína que se une al Ca^{2+} , y han sugerido que dicha proteína puede interaccionar directamente con las células radicales

de la planta mediante una vía Ca-dependiente y, por tanto, mediando una etapa temprana en el reconocimiento entre "Rhizobium" y su leguminosa hospedadora.

El gen nodT

Muchas cepas de R. leguminosarum bv. viciae tienen en común con R. leguminosarum bv. trifolii el nodular el hospedador Trifolium subterraneum (Vincent, 1977). El gen nodT ha sido descrito recientemente en R. leguminosarum bvs. viciae (Canter-Cremers y col., 1989; Surin y Downie, 1990) y trifolii (Surin y col., 1990); localizado en la región nod-nif, la posición de este gen varía en la bv. viciae, detrás de nodN (Canter-Cremers y col., 1989; Surin y col., 1990) y en la bv. trifolii, detrás de nodIJ, muy posiblemente en el operón nodABCIJ (Surin y col., 1990).

La secuencia nucleotídica de nodT predice una proteína localizada en la membrana externa, cuya región amino terminal posee algunas características típicas de péptidos que se secretan a través de la membrana interna bacteriana (Surin y col., 1990).

Los mutantes en nodT de R. leguminosarum bv. viciae dan lugar a un fenotipo de nodulación retrasada en Trifolium subterraneum, por lo que, aparentemente, el gen está implicado en la nodulación de este hospedador, pero no en la de otras plantas como el guisante o Vicia sp. (Surin y col., 1990).

El gen nodX

Los guisantes primitivos de la variedad Afghanistan no pueden ser nodulados por las cepas comerciales (norteamericanas y europeas) de R. leguminosarum bv. viciae; sin embargo, una estirpe, denominada TOM (que fue aislada en Turquía) es capaz de nodular a este hospedador (Lie, 1978; Winarno y Lie, 1979; Young y col., 1982) debido a que posee en su plásmido Sym una pequeña región de ADN que contiene un sólo gen, nodX (Hombrecher y col., 1984). Cuando esta región es transferida a las cepas comerciales de R. leguminosarum bv. viciae, les confiere la capacidad de nodular la variedad Afghanistan (Hombrecher y col., 1984).

Las mutaciones en el gen nodX inhiben selectivamente la nodulación de los guisantes de la variedad Afghanistan pero no la de los guisantes típicos (Götz y col., 1985); así pues, este gen es un ejemplo de gen específico para la nodulación de una planta determinada, lo que es consistente con el hecho de que no existe un gen homólogo a nodX en R. leguminosarum bv. viciae, ni tampoco en R. meliloti, aunque sí en R. leguminosarum bv. trifolii (en esta bv. su papel está aun por aclarar) (Davis y col., 1988); por ello, en la estirpe TOM nodX se puede considerar como un gen extra, más que una forma alélica de otro gen de una cepa típica de R. leguminosarum bv. viciae.

En la estirpe TOM, parece ser que nodX es parte de la u-

nidad transcripcional nodABCIJ (Davis y col., 1988) y su secuencia nucleotídica revela una proteína muy hidrofóbica, que por tanto puede estar localizada en la membrana (41 kDa), pero que no muestra parecido con otras proteínas en las bases de datos (Davis y col., 1988).

nodK y nodY

En Bradyrhizobium sp. (Parasponia) el gen nodK precede a nodA y probablemente se transcribe junto con nodABC (Scott, 1986). Este gen, que no se encuentra en las estirpes de crecimiento rápido, codifica un polipéptido de 14,9 kDa cuya función en el proceso de nodulación permanece aun por aclarar.

En Bradyrhizobium japonicum también se ha descrito un gen delante de nodA (Niewkoop y col., 1987), denominado nodY (Banfalvi y col., 1988); sin embargo, la proteína que codifica sólo comparte un 30% de homología con NodK, por lo que no parecen tratarse del mismo gen.

En B. japonicum, el gen nodY, del que existen secuencias homólogas en la mayoría de las especies de Rhizobium y Bradyrhizobium (Banfalvi y col., 1988), codifica una proteína de 15,8 kDa y se cotranscribe con nodABC.

7.2.- Regulación de los genes nod, el gen nodD

7.2.1.- Antecedentes

Todos los genes nod descritos no se expresan de forma constitutiva y para comprender su modo de inducción hay que considerar en primer lugar el gen nodD y los exudados de la planta. Haciendo un poco de historia, varios laboratorios habían observado que la eficiencia para inducir nodulación por parte de los rizobios se incrementa si estos se exponían a la planta o a exudados procedentes de la planta, y que sustancias de bajo PM producidas por las plantas leguminosas podían estimular la expresión de los genes nod (Mulligan y Long, 1985; Innes y col., 1985; Rossen y col., 1985). Esto implica que en la rizosfera hay una potente inducción de la expresión de los genes nod; además, esta inducción no ocurre si el gen nodD se muta, lo que sugirió que este gen regula la inducción de las otras unidades transcripcionales.

En el siguiente paso para monitorizar la expresión de los genes nod, estos fueron fusionados al gen lacZ de E. coli, el resultado fue que en ausencia de exudados de la planta, solamente se expresa el gen nodD, es decir, su expresión es constitutiva. El resto de los promotores necesitaba, además de exudados de la planta, la presencia del producto del gen nodD (Mulligan y Long, 1985; Rossen y col., 1985; Innes y col., 1985). Además, se ha demostrado la

autoregulación de la expresión de nodD en R. leguminosarum bvs. viciae (Rossen y col., 1985) y trifolii (Spaink y col., 1989), y B. japonicum (Banfalvi y col., 1988).

Otro importante descubrimiento fue la presencia de secuencias conservadas, denominadas "nod boxes" (Rostas y col., 1986) delante de los operones nodABCDEFGHIJ, nodFE(G) y nodH, lo que sugirió que los genes nod se regulaban de forma coordinada.

7.2.2.- Características generales del gen nodD

El gen nodD, muy conservado entre "Rhizobium" sp., está situado al lado de nodA en la mayoría de las especies, y se transcribe en dirección opuesta (Egelhoff y col., 1985; Göttfert y col., 1986; Schofield y Watson, 1986; Scott, 1986; Shearman y col., 1986); aunque fue considerado un gen común, hoy es reconocido como un importante determinante de la especificidad.

Algunas especies de "Rhizobium" contienen una única copia de nodD, como ocurre en las bvs. viciae (Shearman y col., 1986) y trifolii (Innes y col., 1985) de R. leguminosarum o en Rhizobium sp. NGR234 (Bassam y col., 1988); otras especies poseen dos genes nodD, tal es el caso de B. japonicum (Appelbaum y col., 1988; Göttfert y col., 1989), de Rhizobium sp. MPIK3030 (Horvath y col., 1987) y de S. fredii (Ramakrishnan y col., 1986), mientras que R. meliloti y las estirpes tipo I de R. leguminosarum bv. phaseoli (ver) tienen tres copias

del gen regulatorio nodD (Göttfert y col., 1986; Cevallos y col., 1989).

En aquellas especies donde sólo una copia del gen nodD está presente, su mutación conduce a un fenotipo Nod⁻ (Djordjevic y col., 1985; Downie y col., 1985); sin embargo, en R. meliloti, que contiene tres copias de este gen regulador (nodD1, nodD2 y nodD3), sóloamente el mutante triple es incapaz de nodular (Honma y Ausubel, 1987), mientras que las mutaciones en una o dos de las copias dan lugar a un fenotipo de-nodulación retrasada (Göttfert y col., 1986; Honma y Ausubel, 1987; Györgypal y col., 1988).

En relación a los ensayos de complementación interespecífica, en algunos casos existe equivalencia funcional entre los genes nodD pertenecientes a especies relacionadas (Fisher y Long, 1985; Djordjevic y col., 1986; Spaink y col., 1987), lo que implica que todos los genes nodD poseen una función común, la activación de los otros genes nod en presencia de exudados de la planta (Mulligan y Long, 1985; Rossen y col., 1985), motivo por el cual en un principio se consideró a nodD un gen "comun"; sin embargo, en otros casos dicha equivalencia funcional no se ha encontrado, y la transferencia del gen nodD a otra estirpe da lugar a un cambio en su especificidad de hospedador (Horvath y col., 1987; Spaink y col., 1987)

NodD es una proteína de 33 kDa, la cual, por homología de secuencia y comportamiento, se ha incluido en una familia de proteínas activadoras de la transcripción en procariotas que ha sido definida recientemente (Henikoff y col., 1988) y

que incluye a genes tales como lysR o metR; además, Shearman y col. (1986) detectaron homología entre el gen nodD de R. leguminosarum bv. viciae y el gen araC. Como nodD, los genes araC y lysR de E. coli regulan positivamente la expresión de un operón adyacente, transcrito divergentemente, y son auto-regulatorios (su producto controla su propia síntesis), un comportamiento que se ha observado también en los genes nodD de R. leguminosarum bv. viciae (Rossen y col., 1985), R. leguminosarum bv. trifolii (Spaink y col., 1989) y B. japonicum (Banfalvi y col., 1988).

La proteína NodD ha sido localizada en la membrana citoplasmática, esta localización, que es independiente de la presencia de inductores (Schlaman y col., 1989) es muy interesante puesto que la naringenina, un activador de la proteína NodD, posee una alta afinidad por la membrana citoplasmática (Recourt y col., 1989).

7.2.3.- Los factores exudados por la planta, los flavonoides

La inducción de los operones nod requiere, además del producto del gen regulatorio nodD, la presencia de exudados procedentes de la planta hospedadora.

En varios sistemas planta-rizobio, las moléculas inductoras se han purificado a partir de exudados de la planta, identificándose como flavonoides (pequeñas moléculas aromáticas de tres anillos derivadas del metabolismo del fenil-propanoide), flavonas, flavanonas e isoflavonas (Fig).

El principal compuesto inductor del exudado radical del trébol se ha identificado como la 7,4'-dihidroxi-flavona (Redmond y col., 1986), mientras que la luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona) es el inductor más potente encontrado en los exudados de las semillas de alfalfa (Peters y col., 1986; Peters y Long, 1988). La apigenina (5,7,4'-trihidroxi-flavona) también induce a los genes nod de R. meliloti, aunque menos que la luteolina (Peters y col., 1986).

Con respecto a la bv. viciae de R. leguminosarum, se han ensayado una gran variedad de flavonoides sintéticos como inductores de sus genes nod, encontrándose que muchos de ellos podían sustituir al exudado radical de Vicia sativa (Firmin y col.; 1986; Djordjevic y col., 1986; Zaat y col., 1987; Zaat y col., 1988); la naringenina (5,7,4'-trihidroxi-flavanona) parece ser el inductor más efectivo de los probados (Djordjevic y col., 1987; Zaat y col., 1987), habiéndose demostrado que la molécula de naringenina es concentrada rápidamente por la bacterias de R. leguminosarum bv. viciae en su interior, 80 veces con respecto al exterior ().

La naringenina parece ser también un buen inductor de los genes nod de R. leguminosarum bv. phaseoli () y de Azorhizobium caulinodans (Goethals y col., 1989).

En la soja, las isoflavonas parecen ser los inductores naturales de los genes nod de S. fredii (Sadowsky y col., 1988) y B. japonicum (Kosslak y col., 1987; Banfalvi y col., 1988), fundamentalmente la daizeína y la genisteína.

Los genes nod no son únicamente activados por compuestos

específicos del hospedador; otros metabolitos de la planta antagonizan esta inducción (Firmin y col., 1986; Djordjevic y col., 1987). Ciertos flavanoles o isoflavonoides, así como otros compuestos fenólicos (como la acetosiringona) inhiben severamente la transcripción de los genes nod de R. leguminosarum bv. viciae; en el trébol, se ha demostrado que la cumarina umbeliferona y los isoflavonoides formononetina y daizeína, que están presentes en el exudado de esta leguminosa, antagonizan efectivamente la inducción de los genes nod de R. leguminosarum bv. trifolii (Djordjevic y col., 1987); curiosamente, la daizeína actúa como inductor de los genes nod de B. japonicum.

Puesto que los anti-inductores más efectivos poseen características estructurales similares a las moléculas inductoras, parece probable que éstos actúen compitiendo con los inductores a nivel de su producción o en su interacción con el producto del gen nodD. La obtención de mutantes en el gen nodD con los cuales las moléculas que normalmente actúan como anti-inductoras ahora se comportan como inductoras proporciona evidencia de que ambos tipos de moléculas interactúan directamente con la proteína NodD (Burn y col., 1987). Además, posiblemente la concentración de inductores e inhibidores en la rizosfera probablemente tiene consecuencias importantes en el proceso de infección.

7.2.4.- El gen nodD contribuye a la especificidad de hospedador

Es aparente que en algunos casos los genes nodD de diferentes especies de "Rhizobium" son funcionalmente equivalentes y actúan sin afectar el rango de hospedador: cuando el gen nodD de R. meliloti se introdujo en un mutante nodD de R. leguminosarum bv. trifolii, se corrigió el defecto de dicho mutante para nodular el trébol (Fisher y col., 1985); además, tanto los extractos de semillas de alfalfa como la flavona luteolina, un potente inductor de los genes nod de R. meliloti, fueron capaces de inducir los genes nod de R. leguminosarum bv. viciae ().

Sin embargo, en los últimos años se ha acumulado evidencia de que el gen nodD, el activador de la transcripción, también juega un papel en la especificidad de hospedador, y lo hace determinando qué flavonoides son capaces de servir como inductores o inhibidores de los genes nod (Burn y col., 1987; Horvath y col., 1987; Spaink y col., 1987).

En primer lugar, los productos de los genes nodD de las distintas especies de Rhizobium y Bradyrhizobium poseen diferentes requerimientos estructurales para la inducción por determinadas moléculas flavonoides. Por ejemplo, la flavona hesperitina, que induce a los genes nod de R. leguminosarum bv. viciae (Firmin y col., 1986), fue inefectiva con R. meliloti ().

A este respecto, se ha propuesto que R. meliloti utiliza las tres copias de su gen nodD para optimizar la interacción

con cada una de sus leguminosas hospedadoras: Medicago, Melilotus y Trigonella (Györgypal y col., 1988; Honma y col., 1990). En esta especie, los análisis de mutantes han demostrado que cada una de las tres copias son genes nodD funcionales y requeridos para una nodulación efectiva de la alfalfa (Göttfert y col., 1986; Honma y Ausubel, 1987), pero que sin embargo tienen diferentes preferencias de inductor: nodD1, localizado junto a nodABC, activa la transcripción de los genes inducibles en respuesta a la luteolina, mientras que nodD2 responde a un inductor desconocido, distinto a la luteolina (Göttfert y col., 1986; Honma y Ausubel, 1987; Györgypal y col., 1988; Mulligan y Long, 1989; Honma y col., 1990) y nodD3 es capaz de activar constitutivamente y en gran nivel? la expresión de los operones nod, pero él mismo no es expresado excepto bajo el control de otro "locus" similar a nodD, syrM, (Mulligan y long, 1989; Honma y col., 1990).

Por otro lado, varios estudios de complementación soportan la hipótesis de que el gen nodD puede ser un factor determinante de la especificidad de hospedador. Así, el gen nodD de Rhizobium sp. MPIK3030, pudo complementar a un mutante nodD1 de R. meliloti para nodular alfalfa y, simultáneamente, le extendió el rango de hospedador hasta siratro (uno de los hospedadores de Rhizobium sp. MPIK3030); por el contrario, en el experimento inverso, el gen nodD1 de R. meliloti no complementó a un mutante nodD de MPIK3030 para nodular siratro (Horvath y col., 1987). De forma similar, el gen nodD de Rhizobium sp. NGR234 confiere a R. leguminosarum bv. tri-

folii la capacidad de nodular varios de sus hospedadores (Bassam y col., 1988).

Presumiblemente, los genes nodD de MPIK3030 y NGR234, que son dos estirpes de Rhizobium que poseen un rango de hospedador muy amplio, pueden reconocer los exudados de una gran variedad de plantas, mientras que por ejemplo el gen nodD1 de R. meliloti es incapaz de ser activado por los exudados de si-ratro.

Analogamente, cuando el gen nodD de R. leguminosarum bv. viciae se transfirió a un mutante de R. leguminosarum bv. trifolii, le restauró la capacidad de nodular el trébol blanco, uno de los hospedadores de la bv. trifolii, pero los transconjugantes no fueron capaces de nodular el trébol rojo, indicando que este hospedador exuda un inductor que no es reconocido por el gen nodD de R. leguminosarum bv. viciae (Spaink y col., 1987).

7.2.5.- Modelo de regulación de los operones nod

El modelo aceptado actualmente propone que, en respuesta a compuestos flavonoides específicos exudados por la raíz de la planta hospedadora, el producto del gen regulatorio nodD se une a los promotores de los operones nod inducibles y activa su transcripción.

Parece ser que la molécula inductora procedente de la planta se une a la proteína NodD y causa un cambio en su conformación, lo que resulta en una mayor actividad de esta pro-

teína para unirse al ADN de los promotores nod (Hong y col., 1987; Fisher y col., 1988); actualmente se ha demostrado que el producto del gen nodD se une concretamente a los "nod boxes" (cajas de nodulación)(Fisher y Long, 1989; Kondorosi y col., 1989), secuencias muy conservadas de aproximadamente 50 pb, características de todos los operones nod inducibles, y que se localizan en el promotor del primer gen de cada operón nod, es decir nodA, nodF, nodH, nodN, nodY y nodK (Debellé y Sharma, 1986; Schofield y Watson, 1986; Scott, 1986; Shearman y col., 1986; Horvath y col., 1987; Fisher y col., 1987; Spaink y col., 1987; Surin y Downie, 1988; Niewkoop y col., 1987); las cajas de nodulación fueron primeramente definidas en R. meliloti por Rostas y col. (1986) y luego detectadas en otras especies. A diferencia de otros genes nod, no parece existir una secuencia "nod box" entre nodQ y el principio de nodP (Cervantes y col., 1989; Schwedock y col., 1989). Por otro lado, el gen nodO posee en su región 5' una caja nod poco conservada; quizás por este motivo, la regulación de su expresión parece diferente a la de otros genes nod, ya que responde en presencia del inductor naringenina con un incremento de su transcripción cuando existen varias copias del gen nodD ()

Recientemente, Kondorosi y col. (1989) han demostrado que la expresión de los genes nod comunes de R. meliloti AK631 se encuentra tanto bajo control positivo como negativo, existiendo, además del regulador positivo NodD, una proteína represora que está implicada en el control negativo de la ex-

presión de los genes nod. Mientras que la proteína activadora se une a los "nod boxes", requeridos para la regulación coordinada de los genes nod, el represor se une a los promotores, concretamente en una región de ADN de 33 pb que contiene los sitios de iniciación transcripcional (que solapan) de los divergentemente transcritos nodD y nodA. El gen represor se mapeó en el cromosoma de R. meliloti AK631, encontrándose hibridación con R. meliloti 1021 (otra estirpe de R. meliloti muy estudiada), aunque parece ser que en esta cepa el represor no es un gen funcional. Los autores proponen además un modelo de regulación para las estirpes AK631 (con represor) y 1021 (sin represor) de R. meliloti, modelo que además describe la posible interacción entre el inductor luteolina, la proteína NodD y el represor con los promotores nod (Fig. 6). Del hecho de que los mutantes en el gen represor exhibieron un fenotipo de nodulación retrasada se dedujo que este doble control negativo y positivo es requerido para la nodulación óptima de la planta hospedadora.

7.2.6.- Localización de las regiones responsables de las propiedades del gen nodD

En el gen regulador nodD nos encontramos pues con dos propiedades, la capacidad de inducir al resto de los genes nod y su contribución en la determinación de la especificidad de hospedador; en este sentido, la interacción entre NodD y los inductores de la planta es otro punto de control de la

especificidad de la asociación, ya que los genes nod no se transcribirán si el producto del gen nodD no reconoce a una sustancia activadora en el exudado de la planta. Una vez que los operones nod son activados, otros mecanismos relacionados con otros productos de los genes nod aseguran dicha especificidad. Por otro lado, en algunas especies de Rhizobium y Bradyrhizobium el gen nodD se autoregula por su propio producto (Rossen y col., 1985; Banfalvi y col., 1988; Spaink y col., 1989). Recientemente, Dusha y col. (1989) demostraron que en R. meliloti, los genes nodABC, así como el gen regulatorio nodD3 (aunque no nodD1) están bajo control de amonio, sugiriendo los resultados que el producto del gen nodD3 tiene un papel mediando la regulación por amonio de los genes nod tempranos.

Todas estas propiedades parecen ser independientes, como lo demuestran varias líneas de evidencia.

En primer lugar, el análisis genético de mutantes nod. Los genes nodD alterados por mutagénesis despliegan varias categorías de comportamiento, algunos mutantes nodD no son capaces ni de inducir a los operones nod ni de autorregularse, mientras que otros retienen la habilidad de activar los operones nod pero no se autorregulan, o viceversa y otros causan activación de los genes nod sin necesidad de moléculas inductoras, mostrando una hiperinducción en presencia de flavonoides; puesto que esta última mutación se localiza en el extremo carboxilo terminal, se supuso que esta es la parte de la proteína implicada en la interacción entre NodD y los in-

ductores o antiinductores (Burn y col., 1987; Burn y col., 1989).

La comparación de las secuencias nucleotídicas de diferentes genes nodD muestran una gran parte homóloga en la fracción aminoterminal y una parte divergente en la fracción carboxilo terminal (Horvath y col., 1987); realizando construcciones quiméricas con partes de los genes nodD de dos especies de Rhizobium (R. meliloti y Rhizobium sp. MPIK3030), estos autores demostraron que la fracción variable es la responsable del reconocimiento de moléculas inductoras producidas por la planta, mientras que la región conservada es la responsable de la unión al ADN de los "nod boxes".

Se han construido otros genes nodD híbridos, entre los que hay que destacar uno que contiene el extremo 5'(carboxilo) de R. meliloti y el 3'(amino) de R. leguminosarum bv. trifolii, que activa la expresión de los genes nod constitutivamente, en ausencia de inductores, y adquiere un rango extendido para la nodulación; es más, moléculas que normalmente se comportan como antiinductoras, son consideradas por este híbrido como inductoras (Spaink y col., 1989b). En un trabajo más reciente, Spaink y col. (1989a) ensayaron una serie de genes nodD híbridos entre los de R. meliloti y R. leguminosarum bv. trifolii; las conclusiones a las que se llegaron fueron que dos regiones del gen nodD están implicados en la autorregulación, mientras que una región situada en el extremo carboxilo terminal está relacionada con la especificidad de activación por flavonoides; esto último está dea-

cuerdo con trabajos anteriores (Burn y col., 1987; Horvath y col., 1987), sin embargo, los ensayos con otros flavonoides y sustancias como cumarinas indicaron que muchas regiones, dispersas en el total de la proteína están implicadas en la especificidad de activación por flavonoides.

Todos estos datos apoyan el modelo según el cual la proteína NodD interacciona directamente con las moléculas inductoras.

II.- OBJETIVO DEL TRABAJO

Como se puede deducir del resumen sobre la genética de la nodulación expuesto en la Introducción de esta Tesis Doctoral, en este campo los estudios más exhaustivos se han realizado en R. meliloti, B. japonicum y en las biovariedades viciae y trifolii de R. leguminosarum; sin embargo, el conocimiento sobre los genes nod de R. leguminosarum bv. phaseoli es relativamente escaso. Dentro de R. leguminosarum, la biovariedad phaseoli es la menos relacionada con el resto de los representantes de la especie (Jordan y col., 1984).

Las bacterias capaces de nodular P. vulgaris forman un grupo muy heterogéneo, como lo demuestran las diferencias que exhiben las distintas estirpes con respecto a criterios tales como patrones de proteínas (Roberts y col., 1984) o resistencia a los antibióticos (Beynon y Josey, 1980), mostrando una variabilidad genética tan elevada (Piñero y col., 1988), que ha llevado a proponer la subdivisión de la biovariedad en dos tipos (Martínez y col., 1985; Palacios y col., 1987; Martínez y col., 1990). Esta subdivisión está basada fundamentalmente en el rango de hospedador y en el número de copias de los genes nif: las cepas del tipo I poseen un rango de hospedador limitado a plantas de Phaseolus vulgaris, y tienen repetidos los genes de la nitrogenasa en el plásmido simbiótico; por el contrario, las estirpes del tipo II, entre las que se encuentra CIAT899, contienen sólo una copia de los genes nif en su pSym y poseen un rango de hospedador más amplio, siendo capaces de establecer simbiosis efectivas con leguminosas filogenéticamente poco relacionadas con P. vulgaris, como son

Macrottilium atropurpureum (siratro) y Leucaena esculenta.

Otra característica diferencia a ambos tipos de R. leguminosarum bv. phaseoli: cuando el plásmido Sym de las estirpes del tipo I se transfiere a Agrobacterium tumefaciens, los transconjugantes son capaces de inducir nódulos en frijol, pero estos no fijan nitrógeno (Brom y col., 1988), sin embargo, la transferencia a A. tumefaciens de los pSym de varios representantes del tipo II (como las estirpes CIAT899 o CFN299) da lugar a transconjugantes capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las plantas hospedadoras (Martínez y col., 1987; Brom y col., 1988).

Hasta la fecha, el análisis genético de las regiones de nodulación de R. leguminosarum bv. phaseoli se ha restringido sólo a dos representantes de tipo I: las estirpes 8002 y CE3 (Lamb y col., 1985; Cevallos y col., 1989), cuya organización, aún poco caracterizada, se ilustra en la Fig. 5. Sin embargo, no hay nada descrito sobre las regiones de nodulación de las estirpes de amplio rango de hospedador, es por ello que ha sido éste el objetivo del presente estudio: clonar y caracterizar los genes de la nodulación (genes nod) de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899, dirigiendo parte de las investigaciones al estudio de los genes implicados en la determinación del rango de hospedador.

La estirpe CIAT899 de R. leguminosarum bv. phaseoli procede de Colombia (Martínez y col., 1985); antes de iniciar el estudio, y gracias a los trabajos de Martínez y col. (1985) y Brom y col. (1989), se conocía que esta cepa posee dos

plásmidos (Fig), de pesos moleculares 120 MDa (plásmido a) y 215 MDa (plásmido b), tanto por hibridación frente a una sonda nifH como por experimentos de transferencia a A. tumefaciens (Brom y col., 1988), que el mayor de los dos (b) es el plásmido simbiótico; sin embargo, también el plásmido (a) debe contener alguna información simbiótica, ya que la transferencia simultánea de ambos plásmidos, a y b, a A. tumefaciens dio lugar a transconjugantes que indujeron nódulos con un mayor porcentaje de fijación que aquellos formados por A. tumefaciens que contenían sólo el plásmido Sym (Brom y col., 1988).

Además de este conocimiento sobre la estirpe a estudiar, al comenzar el trabajo se contaba con un derivado de la cepa silvestre curado del plásmido simbiótico, la estirpe RSP900, que fue obtenido por M. Megías mediante tratamiento con calor y que da lugar a un fenotipo Nod^- en todas las plantas hospedadoras.

III.- MATERIALES Y METODOS

1.- BACTERIAS Y PLASMIDOS

En la Tabla VI se muestran las cepas bacterianas y los plásmidos (o cósmidos) que se han utilizado en el presente trabajo.

2.- SONDAS DE HIBRIDACION

Como sondas de hibridación se usaron fragmentos de ADN que contenían genes nod previamente caracterizados, y que se obtuvieron a partir de geles de agarosa como se describe en el apartado 11.

En los ensayos de hibridación preliminares, se usó un fragmento EcoRI de 8,5 kb que contiene los genes nod "comunes de la estirpe R. meliloti 41 ().

Como detectores nodAB, nodC y nodD se utilizaron los genes correspondientes de R. meliloti 41: los genes nodAB están comprendidos en un fragmento EcoRI de 1,5 kb del plásmido pJS204 (Schmidt y col., 1984), la sonda nodC fue un fragmento EcoRI de 1,8 kb contenido en el plásmido pJS209 (John y col., 1985), y un fragmento AvaI-BglII del clon pKSK5 se utilizó como sonda intragénica nodD (Schmidt y col., 1984). Como detectores nodIJ y nodE se usaron los genes de R. leguminosarum bv. viciae 248: la sonda nodIJ fue un fragmento EcoRI de 3,2 kb contenido en el plásmido pIJ1271 (Evans y Downie, 1986), mientras que el detector nodE fue un fragmento EcoRI-ClaI del plásmido pIJ1216 (Shearman y col.,

1986). Finalmente, como sonda nifH se usó un fragmento **** de 300 pb del gen nifH de R. leguminosarum bv. phaseoli CFN42.

3.- MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las estirpes de Rhizobium se cultivaron a 28°C en medio TY (Beringer, 1974) o en medio mínimo GGM (excepto en el caso de R. meliloti en el que se usó medio mínimo GSM). Los cultivos de Agrobacterium tumefaciens también se cultivaron a 28°C pero en medio LB (Miller, 1972) o en medio mínimo GGM. Las cepas de Escherichia coli se cultivaron en medio LB a 37°C.

La composición del medio mínimo GGM, por litro, fue la siguiente:

NH ₄ Cl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Glutamato sódico	2,0 g
Solución de sales ⁽¹⁾	100 ml
Solución de FeCl ₃ ⁽²⁾	1 ml
Solución de vitaminas ⁽³⁾	1 ml
Solución de micronutrientes ⁽⁴⁾	1 ml

(1) Solución de sales:

MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂	0,4 g
H ₂ O dest.	c.s.p. 1 l

(2) Solución de Fe₃Cl:

FeCl ₃	20 g
H ₂ O dest. c.s.p.	1 l

(3) Solución de vitaminas:

Biotina	10 mg
Tiamina	10 mg
Ac. pantoténico	10 mg
H ₂ O dest. c.s.p.	10 ml

(4) Solución de micronutrientes

MnSO ₄ .4H ₂ O	0,22000 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00240 g
ZnSO ₄	0,00300 g
H ₃ BO ₃	0,01860 g
Na ₂ MoO ₄	0,00036 g
Citrato férrico	2,50000 g
H ₂ O dest. c.s.p.	1 l

La composición del medio mínimo GSM es exactamente igual a la del medio GGM, excepto en el glutamato sódico, que se sustituye por ácido succínico (2,00 g).

TABLA VI. Bacterias y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepa bacteriana o plásmido	Características	Fuente o referencia
<u>A.- Cepas bacterianas</u>		
<u>Rhizobium leguminosarum</u>		
<u>bv. phaseoli</u>		
CIAT899	silvestre, Rif ^R Cm ^R Amp ^R	Martínez y col. (1985)
RSP900	derivada de CIAT899 curada del pSym, Rif ^R Cm ^R Amp ^R	M. Megías
CE3	derivada Str ^R NaI ^R de la estirpe silvestre CFN42	Noel y col. (1984)
CFN2001	derivada de CFN42 curada de los plásmidos p42a y p42d, Rif ^R	Palacios y col. (1983)
<u>bv. trifolii</u>		
RS1051	derivada Rif ^R Spc ^R de la estirpe silvestre RS800	Rodríguez- Quiñones y col. (1989)
RS1043	derivada de RS1051 curada del pSym, Rif ^R Spc ^R	Rodríguez- Quiñones y col. (1989)
<u>Rhizobium meliloti</u>		
102F34	silvestre	Dylan y col. (1986)
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>		
GMI9023	derivada de la estirpe C58 curada de sus dos plásmidos (pAt-, Ti-) Rif ^R	Rosenberg y col. (1984)
<u>Escherichia coli</u>		

HB101	F ⁻ , <u>hsdS</u> , <u>hsdM</u> , <u>pro</u> , <u>leu</u> , <u>thi</u> , <u>gal</u> , <u>lacY</u> , <u>recA</u> , Str ^R	Boyer y Rouland-Du- ssoix (1969) ***
JM83		***

B.- Plásmidos

pVK102	cósmido derivado de pRK290. Km ^R , Tc ^R	Knauf y Nester (1982)
pRK2013	plásmido helper, Km ^R	Figurski y Helinski (1979)
pNC206	plásmido helper IncP1 Amp ^R , Km ^R	A. Pühler
pRK404	plásmido derivado de pRK290, Tc ^R , Lac	Ditta y col. (1985)
pUC19	plásmido vector, Lac Amp ^R	***
pCV38	inserto de 28,8 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <u>HindIII</u> de pVK102	Este trabajo
pCV117	inserto de 27,5 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <u>HindIII</u> de pVK102	Este trabajo
pCV61	inserto de 26,5 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <u>HindIII</u> de pVK102	Este trabajo
pCV65	inserto de 23,5 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <u>HindIII</u> de pVK102	Este trabajo
pCV3820	inserto de 22,0 kb del pSym de CIAT899 clonado en el sitio <u>EcoRI</u> de pSUP205	J. Martínez (U.B.M y B.V.)
pCV3821	fragmento <u>EcoRI</u> de 16 kb de pCV3820	J. Martínez (U.B.M. y

	subclonado en pSUP205	B.V.)
pCV3822	fragmento <u>EcoRI</u> de 6,2 kb de pCV3820 subclonado en pSUP205	J. Martínez (U.B.M. y B.V.)
pCV3801	fragmento <u>BamHI</u> de 8,0 kb de pCV38 subclonado en pRK404	Este trabajo
pCV3802	fragmento <u>HindIII</u> de 2,4 kb de pCV38 subclonado en pRK404	Este trabajo
pCV3803	fragmento <u>HindIII</u> de 4,0 kb de pCV38 subclonado en pRK404	Este trabajo
pCV3804	fragmento <u>HindIII</u> de 6,4 kb (digestión parcial) de pCV38 subclonado en pRK404	Este trabajo
pCV3805	fragmento <u>HindIII</u> de 2,4 kb de pCV3804 subclonado en pUC19	Este trabajo
pCV3806	fragmento <u>HindIII</u> de 4,0 kb de pCV3804 subclonado en pUC19	Este trabajo
pCV3807	fragmento <u>HindIII</u> de 6,4 kb (digestión parcial) de pCV3804 subclonado en pUC19	Este trabajo

U.B.M. y B.V. : Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México). Cuernavaca (Morelos), México.

4.- ANTIMICROBIANOS Y PRODUCTOS QUIMICOS AÑADIDOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los antimicrobianos estreptomina, ácido nalidíxico, kanamicina y ampicilina se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración; la rifampicina se disolvió en metanol, el cloranfenicol en etanol, y la tetraciclina en una mezcla a partes iguales de etanol/agua destilada.

Todos las soluciones de antimicrobianos se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización, añadiéndose a los medios a las concentraciones finales abajo indicadas:

Estreptomina (Str)	500	g/ml para <u>E. coli</u>
	100	g/ml para <u>Rhizobium</u>
Acido nalidíxico (Nal)	10	g/ml
Kanamicina (Km)	50	g/ml
Ampicilina (Amp)	100	g/ml para <u>E. coli</u>
	250	g/ml para <u>Rhizobium</u>
Rifampicina (Rif)	50	g/ml
Cloranfenicol (Cm)	50	g/ml
Tetraciclina (Tc)	15	g/ml

El producto Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- -galactósido) (Boehringer-Mannheim, R.F.A) se conservó al 2% en dimetil-formamida a -20°C, y se añadió a los medios a una concentración final de 40 g/ml. El inductor IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranosido) (Boehringer-Mannheim, R.F.A) se disolvió al 2,5% en agua bidestilada estéril y se conservó a -20°C, añadiéndose a los medios de cultivo a una concentra-

ción final de 25 g/ml.

El inductor naringenina se obtuvo de Sigma, se disolvió en agua destilada y se esterilizó por filtración, añadiéndose a los medios a una concentración final 120 nM. *****

5.- ENZIMAS E ISOTOPOS

Todas las enzimas se utilizaron según las instrucciones de los suministradores.

Las endonucleasas de restricción BamHI, BglII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, SalI y XhoI, junto con sus tampones de incubación correspondientes, se obtuvieron de Boehringer-Mannheim (R.F.A).

La enzima T4 DNA ligasa fue proporcionada por Boehringer-Mannheim (R.F.A) y se utilizó en el siguiente tampón de incubación:

Tampón de ligasa:

Tris HCl pH 7,6	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
ATP	0,6 mM

La fosfatasa alcalina de intestino de ternera se obtuvo de Boehringer-Mannheim (R.F.A), y se usó en el siguiente tampón de incubación:

Tampón de CAP:

Tris HCl pH 9,0	50 mM
MgCl ₂	1 mM

ZnCl ₂	0,1 mM
Espermidina	1 mM

El isótopo radioactivo ⁻³²p-dCTP se adquirió a Amersham International en forma de solución acuosa.

6.- ENSAYOS DE NODULACION

En los ensayos de nodulación se emplearon plantas de Phaseolus vulgaris var. Negro Jamapa (frijol), Leucaena esculenta (leucaena) y Macroptilium atropurpureum (siratro). Todas las semillas fueron amablemente proporcionadas por la Unidad de Biología Molecular de Plantas y Biotecnología Vegetal de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México).

Debido a su dureza, las semillas de L. esculenta se calentaron en agua a 80°C durante 10 minutos antes de proceder a su esterilización superficial.

Todas las semillas se esterilizaron superficialmente mediante dos tratamientos sucesivos con etanol de 96% (3 minutos) y lejía comercial diluída al 20% (15 minutos), tras lo que se enjuagaron abundantemente con agua destilada estéril y se dejaron germinar en placas de agar-agua (9 g de agar/l de H₂O dest.) durante 48 horas.

Una vez germinadas, las semillas se colocaron adecuadamente en recipientes estériles que contenían vermiculita empapada en solución nutritiva de Fahraeus (), y se inocularon con 1 ml de una suspensión bacteriana que

contenía aproximadamente 10^8 células/ml.

Los recipientes con las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de plantas a 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad.

La presencia o ausencia de nodulación se analizó periódicamente, dándose por finalizado el ensayo a las 4 semanas de la inoculación.

7.- ENSAYO DE EFECTIVIDAD

La capacidad fijadora de nitrógeno se entendió como actividad nitrogenasa, que se midió de forma indirecta como la reducción de acetileno a etileno por parte de los nódulos de la raíz, utilizándose para ello un cromatógrafo de gases, según la técnica descrita por Masterson y Murphy (1980).

8.- REAISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE NODULOS

Los nódulos se esterilizaron superficialmente con etanol de 96% durante 5 minutos; a continuación se lavaron abundantemente con agua destilada estéril y se trituraron con una varilla de vidrio, sembrándose la masa resultante en placas de medio rico TY (Beringer, 1974).

Las colonias resultantes se probaron siempre en los medios selectivos adecuados.

9.- ANALISIS DEL PERFIL DE PLASMIDOS

Para ello, se empleó la electroforesis horizontal en gel de agarosa, utilizando una técnica de lisis directa en pocillos descrita por Rodríguez-Quiñones y col. (1989), a su vez inspirada en la originalmente descrita por Eckhardt (1978) y modificada por Rosenberg y col. (1982).

10.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El ADN purificado, total o digerido, se corrió en geles horizontales de agarosa sumergidos en tampón TEA (Tris-acetato, 40 mM; Na₂ AEDT, 1mM; pH 8,0) y preparados, por lo general, al 1% en el mismo tampón, tal y como indican Maniatis y col. (1982). Los geles se tiñeron durante una hora con bromuro de etidio (0,5 g/ml en agua destilada), se destiñeron posteriormente 20 minutos en agua destilada y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta a 360 nm, fotografiándose finalmente con película Kodak Tri-X Pan 400 ASA y filtro Kodak Wratten NQ 23 A.

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon según la curva lg Peso molecular-movilidad, obtenida de acuerdo con las distancias de migración de los fragmentos HindIII del ADN del estándar cI857Sam7 (Boehringer-Mannheim, R.F.A): 23,1; 9,5; 6,7; 4,3; 2,3; 2,0 y 0,5 kb.

Para el cálculo de pesos moleculares de fragmentos de ADN de tamaño elevado, se empleó como patrón Xho I (bandas

de 15,0 y 33,5 kb) o una mezcla / XhoI+ /HindIII, cargando dichos patrones en pocillos vecinos a los de las muestras, y empleándose en este caso geles de agarosa de baja concentración (generalmente 0,6%), corridos a baja tensión durante un largo tiempo.

11.- RECUPERACION DE ADN A PARTIR DE LOS GELES

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles mediante la técnica de electroelución (Maniatis y col., 1982), seguida de purificación con fenol/ Cl_3CH y precipitación con alcohol de 96%.

12.- EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN

12.1.- ADN total

El ADN genómico total de las especies de Rhizobium se obtuvo por lisis con SDS/pronasa (sigma), seguida de sucesivas purificaciones (con fenol, fenol/ Cl_3CH y Cl_3CH), precipitación con etanol 96% y lavado con etanol 70%, exactamente como se describe en Maniatis y col. (1982).

2.- ADN plásmidico

a) De E. coli.- El ADN de plásmidos o cósmidos, tanto a gran escala como en minipreparaciones (a partir de un litro o de 1 ml de cultivo), se aisló por el método de lisis alcalina descrito en el manual de Maniatis y col. (1982).

En las preparaciones a gran escala, El ADN se purificó

adicionalmente por centrifugación en gradiente de CsCl-bromuro de etidio, cargándose por cada litro de muestra un gradiente de 34 ml, que se centrifugó en un rotor vertical Sorvall TV 850 durante 20 horas, a 39000 rpm y 18°C.

Cuando se precisó una mayor purificación (por ejemplo, para preparar ADN que va a servir como vector en la obtención de un banco de genes), el ADN obtenido en la primera ultracentrifugación se recuperó del gradiente y se cargó directamente en otro gradiente de 4,5 ml, que se centrifugó a 39000 rpm durante 48 horas en un rotor basculante Sorvall AH 650.

Tras la última centrifugación, el bromuro de etidio se extrajo con alcohol isoamílico y el CsCl se eliminó por diálisis prolongada frente a Tris HCl 10 mM, pH 8,0 -Na₂ AEDT 1 mM. Cuando fue requerido, el ADN se concentró por precipitación con etanol.

b) De Rhizobium.- Los plásmidos y cósmidos recombinantes contenidos en Rhizobium se aislaron por una modificación del método de Ish-Horowicz y Burke (1981): las células de 5 ml de un cultivo en fase estacionaria temprana son recogidas y lavadas con 150 μ l de TEN (tris-HCl 10 mM, pH 8,0; Na₂ AEDT 1 mM; NaCl 100mM) conteniendo un 0,1% de sarcosil (Sigma). Tras centrifugación, las células son resuspendidas en 160 μ l de solución I (Tris-HCl 25 mM; AEDT Na₂ 10 mM; glucosa 50 mM; pH 8,0) y dejadas 15 minutos a temperatura ambiente. Se añaden a continuación 200 μ l de solución II (NaOH 0,2 N; SDS 1%) recién preparada, y tras 10 minutos en hielo se adicionan 250 μ l de solución III (acetato potásico 5 M, pH 4,8), dejando

progresar la reacción otros 10 minutos en hielo. Tras centrifugar, el sobrenadante es fenolizado y el ADN es finalmente precipitado con etanol de 96% y lavado con etanol de 70%.

13.- PREPARACION Y AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN TOTAL PARCIALMENTE DIGERIDO

Las condiciones para la digestión parcial del ADN de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 se establecieron por tratamiento de la misma cantidad de ADN con una cantidad fija de enzima, en tiempos variables (Maniatis y col., 1982).

La digestión parcial a gran escala se llevó a cabo en las condiciones en que se encontró una mayor fluorescencia en la región de 25-35 kb, pero añadiendo la mitad de unidades de HindIII, con objeto de minimizar la sobreestimación de tamaños moleculares observada en los geles cuando el peso molecular de las bandas es elevado (Seed y col., 1982).

La separación de los fragmentos del tamaño deseado se consiguió mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (10%-40%), tal y como se recomienda en el manual de Maniatis y col. (1982) y utilizando un rotor basculante Sorvall AH 650, en el que las muestras se centrifugaron a 26000 rpm durante 20 horas a 20°C. Por cada gradiente (4,5 ml) se cargaron aproximadamente 100 g de ADN parcialmente digerido.

Una vez centrifugadas las muestras, se recogieron fracciones de aproximadamente 75 μ l, que fueron analizadas por electroforesis en geles de baja concentración de agarosa

(0,6%), corridos a baja tensión durante un largo tiempo, y en los que se incorporó el patrón de tamaños /XhoI. Las fracciones que contenían ADN de tamaño comprendido entre 25-35 kb se diluyeron con agua bidestilada estéril hasta una concentración de sacarosa igual o inferior al 10%, y entonces fueron precipitadas con etanol de 96%, lavadas con etanol de 70% y guardadas a 4°C hasta su utilización.

14.- MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE ADN

14.1.- Conjugación

La conjugación triparental se realizó según lo descrito por Ditta y col. (1980). Así, 0,1 ml de cultivo en fase estacionaria temprana del donador se mezclaron con 0,1 ml del receptor y 0,1 ml de un cultivo de E. coli que contenía el plásmido "helper", ambos también en fase estacionaria, sobre una placa de Petri con medio rico TY. Tras 16 horas de incubación a 30°C, la masa bacteriana se recogió en 5 ml de solución salina estéril al 0,9%, sembrándose posteriormente en los medios selectivos apropiados tras las diluciones oportunas.

Los "helpers" utilizados fueron pRK2013, para los plásmidos contruidos en los vectores pVK102 y pRK404, y pNC206, para los plásmidos contruidos en el vector pSUP205.

La selección de los transconjugantes se realizó en medio mínimo GGM con Tc y Rif (para A. tumefaciens, R. leguminosa-

rum bv. phaseoli RSP900 y CFN42 y R. leguminosarum bv. trifolii), GGM con Tc y NaI (para la estirpe CE3 de R. leguminosarum bv. phaseoli), o GSM con Tc (para R. meliloti)

14.2.- Transformación

Las células de E. coli se hicieron competentes y se transformaron básicamente por la técnica descrita por Cohen y col. (1972). Se tomaron 40 ml de un cultivo de HB101 o JM83 y se incubaron hasta una DO_{600} de 0,6. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 40 ml de $MgSO_4$ 10 mM- Tris HCl 5 mM (pH 7,4), previamente enfriados en hielo. Tras 30 minutos en hielo, las células fueron de nuevo sedimentadas, resuspendidas en 40 ml de $CaCl_2$ 50 mM-Tris HCl 5 mM (pH 7,4) a 0°C y mantenidas durante 20 minutos más en hielo. Finalmente, las células competentes se recuperaron por centrifugación suave (4000 rpm) y se resuspendieron en 200 μ l de $CaCl_2$ 50 mM-Tris HCl 5 mM (pH 7,4) pre-enfriados en hielo, conservándose a 4°C hasta su utilización, que fue siempre en las 24 horas siguientes a su preparación.

Para los 200 μ l de células competentes (provenientes de 40 ml de cultivo) se observó una eficacia máxima de transformación para 0,4-0,6 μ g de ADN, disminuyendo bruscamente dicha eficiencia cuando se añade más de 1 μ g de ADN. Así pues, en las transformaciones siempre se guardó la proporción 200 μ l de células competentes/0,5-1 μ g de ADN.

La mezcla de ADN y células competentes se mantuvo en

hielo durante una hora, exponiéndola luego a un choque térmico de 42°C durante 2 minutos, tras lo cual se añadió 1 ml de LB estéril y se incubó 30-60 minutos a 37°C para permitir la expresión de los marcadores. Por último, las células se concentraron por centrifugación, se resuspendieron en 200 l de LB estéril, y se sembraron en los medios selectivos para los transformantes.

14.3.- Transducción

Se siguió, con algunas modificaciones, el protocolo de Maniatis y col. (1982). Se tomaron 0,5 ml de un cultivo de 24 horas de E. coli HB101 y se diluyeron con 4,5 ml de LB estéril que contenían un 0,4% de maltosa. Tras 4 horas de incubación a 37°C, las células se recogieron y resuspendieron en 1 ml de MgSO₄ 10 mM estéril.

Los fagos se añadieron directamente a las células así tratadas, permitiéndose la adsorción por incubación a 37°C durante 20 minutos. A esta mezcla se añadieron 5 ml de LB estéril con un 0,4% de maltosa, incubándose 45-60 minutos para permitir la expresión del marcador. Finalmente, las células se concentraron en 1 ml de LB y se sembraron en los medios selectivos para los transductantes.

15.- MARCAJE DE LAS SONDAS DE ADN

Los fragmentos de ADN que iban a ser usados como sondas radioactivas se marcaron mediante el sistema "multiprime", utilizando para ello un kit ("Multiprime DNA labelling system", Amersham Int. código RPN 1601), siguiendo las instrucciones y recomendaciones suministradas con dicho kit.

Por lo general, y para una reacción estándar de 50 μ l de volumen final, se marcaron 0,5-1 μ g de ADN utilizando 50 μ ci de 32 P-dCTP (Amersham Int.). En todos los casos, se consiguieron actividades entre 1×10^8 y 1×10^9 cpm/ μ g de ADN.

Una vez finalizado el tiempo de la reacción de marcaje, dicha reacción se paró por adición de 30 μ l de tampón de terminación (16 μ l de AEDT 100 mM, 2,5 μ l de SDS al 20%, 0,5 μ l de ADN de esperma de salmón 20 mg/ml y 11 μ l de agua bidestilada). La eliminación de los nucleótidos no incorporados se llevó a cabo mediante precipitación de la sonda radioactiva con etanol de 96% (-20°C), tras lo cual dicha sonda se disolvió en agua bidestilada y se desnaturalizó por adición de 1/10 de volumen de NaOH 3 N, con lo que la sonda quedó dispuesta para ser añadida a las bolsas de hibridación.

16.- HIBRIDACIONES DE ADN

Las hibridaciones de ADN se realizaron, con mínimas modificaciones, según lo descrito por Kondorosi y col. (1982).

16.1.- Preparación de las membranas

Los geles de agarosa se desnaturalizaron con NaOH y se neutralizaron con Tris HCl pH 8,0, exactamente como se describe en el manual de Maniatis y col. (1982). El ADN de los geles se transfirió a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Int., 0,45 m de diámetro de poro) por capilaridad, siguiendo la técnica de Southern (1975) y utilizando SSC 20X como solución de transferencia (SSC 1X = NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M; pH 7,0). Una vez efectuada la transferencia, las membranas se lavaron en SSC 2X y se secaron, primero a temperatura ambiente y luego durante 2 horas a 80°C (para lograr la fijación del ADN a la membrana).

16.2.- Prehibridación

Los filtros se prehibridaron durante 12 horas a 37°C en bolsas herméticamente selladas y que contenían aproximadamente 15 ml de tampón de hibridación: SSC 3X, 50% de formamida desionizada, Na₂HPO₄ 25 mM, NaH₂PO₄ 25 mM, 0,02 % de BSA, PVP y Ficoll 400 (Pharmacia), y 500 g/ml de ADN de esperma de salmón (Sigma), previamente desnaturalizado con NaOH, desproteinizado con proteinasa K (Boehringer-Mannheim) y fenolizado.

16.3.- Hibridación

La hibridación se llevó a cabo durante 24 horas en las mismas condiciones que la prehibridación, pero añadiendo a la solución anterior la sonda radioactiva (10⁸-10⁹ cpm/ g de

ADN), previamente desnaturalizada por la adición de 1/10 de volumen de NaOH 3 N.

16.4.- Lavado de las membranas

Tras la hibridación, las membranas se lavaron a 42°C: dos veces durante 1 hora con una solución que contenía 0,05% de SDS y SSC 2X, y cuatro veces durante 30 minutos con SSC 2X.

16.5.- Exposición de las membranas

Una vez secas, las membranas se expusieron a -70°C sobre película Kodak X-Omat R, con pantalla amplificadora Kodak, durante 1-3 días, al cabo de los cuales se procedió al revelado de las películas, utilizando soluciones de revelador y fijador suministrados por Kodak.

IV.- RESULTADOS

1.- CLONACION DE LOS GENES DE NODULACION DE LA ESTIRPE
CIAT899 DE Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli

1.1.- Construcción de un banco de genes de Rhizobium
leguminosarum bv. phaseoli CIAT899

El primer paso para el aislamiento e identificación de los genes de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 implicados en la nodulación fue la construcción de un banco de genes de dicha estirpe, que se obtuvo como se esquematiza en la Figura 7.

Tras establecer las condiciones idóneas, el ADN total de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 se digirió parcialmente con la endonucleasa HindIII y se fraccionó mediante un gradiente de sacarosa, recogiendo las alícuotas que contenían ADN de tamaño comprendido entre 25 y 35 kb, tal y como se indica en Materiales & Métodos (13).

Por otro lado, el vector pVK102 fue purificado dos veces por gradiente de CsCl-bromuro de etidio, linearizado con HindIII y tratado con fosfatasa alcalina con el objeto de defosforilar sus extremos 5'.

Tanto el vector como el ADN a insertar fueron precipitados, redisueltos y mezclados en un volumen calculado para una concentración final de 50 g/ml para el vector y 400 g/ml para el ADN de CIAT899, equivalente a un exceso molar aproximado de 8:1 para este último. Esta mezcla fue ligada con T4 ligasa durante 5 horas a temperatura ambiente y finalmente

encapsidada "in vitro", para lo que usamos un Kit comercial (Lambda-DNA "in vitro" packaging kit, Amersham Int.), siguiendo las instrucciones y recomendaciones allí descritas.

La mezcla resultante de la encapsidación se usó para infectar *E. coli* HB101. Tras 45 minutos de crecimiento a 37 °C, las células se sembraron en medio LB adicionado de 15 g/ml de tetraciclina, y se incubaron durante 24 horas a 37°C, obteniéndose más de 15000 transductantes.

1.2.- Análisis de la calidad del banco

Como demostración indirecta de la inserción de los fragmentos en el sitio HindIII de pVK102 (lo que inactiva el gen de resistencia a la kanamicina), 300 colonias del banco se sembraron en LBTc y LBKm. Sólo tres de ellas, probablemente dímeros del vector o mutantes espontáneos, resultaron ser Km^R.

De las 297 colonias restantes (Tc^RKm^S), se escogieron al azar 30, a las que se extrajo ADN plasmídico por medio de minipreparación, que se cortó con HindIII con objeto de reafirmar la presencia de insertos, además de calcular el tamaño promedio de éstos.

La Figura 8 muestra el patrón de bandas HindIII de los clones analizados, para los que se estimó un tamaño medio de inserto de 29,5 kb, siendo de 18,7 kb el inserto de menor longitud encontrado y de 40,5 kb el mayor.

Suponiendo que *R. leguminosarum* bv. phaseoli tiene un

tamaño genómico equivalente al de E. coli (4100 kb), y teniendo en cuenta la expresión de Clarke y Carbon (1979):

$$P = 1 - (1-f)^N$$

en la que P es la probabilidad en tanto por uno de encontrar un fragmento de ADN en el banco, N representa el número de recombinantes y f la fracción clonada del total del genoma, para un tamaño medio de inserto de 29,5 kb, se obtendrá una $P = 0,99$ cuando

$$N = \ln(1-0,99) / \ln\left(1 - \frac{29,5}{4100}\right) = 637$$

lo que quiere decir que con sólo 637 colonias se tiene una certeza del 99% de contener la totalidad del genoma, o lo que es lo mismo, con 643 clones, si suponemos que sólo el 99% de ellos (297 de 300) contienen insertos. Así pues, queda asegurada la clonación del genoma completo de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899.

El total de transductantes obtenidos se recogieron en 15 ml de LB , se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos y, tras lavar con LB y volver a centrifugar, las células se re-suspendieron en 30 ml de una mezcla glicerol:LB al 50% adicionada de 1.5 ml de Tc (1mg/ml); finalmente, se repartieron en viales estériles en alícuotas de 3ml, que se conservaron a -20°C para posteriores estudios.

1.3.- Aislamiento de cósmidos recombinantes portadores de los genes nod de CIAT899

Para aislar los genes nod de CIAT899 se utilizó el procedimiento de complementación, que, aunque más lento y laborioso que la hibridación "in situ", es el único que nos asegura la funcionalidad de los genes clonados.

El banco de genes completo fue introducido, mediante la técnica de conjugación triparental, en dos estirpes Nod⁻: R. leguminosarum bv. phaseoli RSP900 (un derivado de CIAT899, curado del plásmido simbiótico) y A. tumefaciens GMI9023 (un derivado de A. tumefaciens C58, curado de sus dos plásmidos), seleccionando los transconjugantes en medio mínimo GGM adicionado de Tc y Rif; al menos 2000 colonias provenientes de cada conjugación se recogieron en medio Gibson a una concentración aproximada de 10^8 células por ml, y se inocularon "en masa" en semillas germinadas de frijol, usando un total de 24 plantas por ensayo de complementación.

Al cabo de 21 días, se observó la presencia de nódulos radicales en las plantas inoculadas, obteniéndose 19 plantas noduladas de las inoculadas con los transconjugantes de RSP900 y sólo 4 plantas con nódulos en el caso de las inoculadas con los transconjugantes de GMI9023.

De cada planta nodulada se tomaron 5 nódulos, de los que se reaislaron bacterias, sembrándolas primero directamente en medio TY con Tc y posteriormente comprobando la resistencia a la rifampicina de las cepas receptoras RSP900 y GMI9023.

De dichas bacterias reaisladas se extrajo ADN plasmídico

por minipreparación, y éste se usó para transformar E. coli HB101, utilizando 100 μ l de células competentes para cada transformación, seleccionando los transformantes en medio LB adicionado de tetraciclina; de estos transformantes también se obtuvieron sus ADNs plasmídicos, que fueron luego digeridos con HindIII y analizados en gel de agarosa (Fig. 9a).

Fundamentalmente se encontraron cuatro tipos de cósmidos, cuya denominación y tamaños moleculares se resumen en la Tabla VII .

1.4.- pCV38, pCV117, pCV61 y pCV65 son cósmidos solapados

Según el patrón de restricción obtenido, parece ser que los cuatro cósmidos comparten algunas de las bandas HindIII, es decir, que son cósmidos solapados. Para verificarlo, los plásmidos pCV38, pCV117, pCV61 y pCV65 fueron digeridos con otras endonucleasas diferentes a HindIII, tales como EcoRI, BamHI y PstI (Fig. 9b, 9c y 9d). De nuevo se obtuvieron bandas comunes, lo que nos permitió confirmar el solapamiento, así como la construcción de un mapa HindIII de dichos cósmidos (Fig. 10).

TABLA VII. Cósmidos reaislados de nódulos de frijol tras complementación de dos derivados Nod⁻ con un banco de genes de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899.

TAMAÑOS MOLECULARES DE	COSMIDOS			
	pCV38	pCV117	pCV61	pCV65
Bandas <u>Hind</u> III (a)	21	21	21	21
	4	4	4	-
	2,4	2,4	-	-
	1,4	-	1,4	1,4
	-	-	-	1,2
Total del inserto	28,8	27,5	26,5	23,5
Cósmido completo (b)	51,8	50,5	49,5	46,5

(a) Los tamaños de los fragmentos de ADN, expresados en kb, fueron calculados según el patrón Lambda/HindIII.

(b) Resultante de la suma inserto + vector pVK102 (23 kb).

2.- ANALISIS DE LOS COSMIDOS RECOMBINANTES

2.1.- Ensayo de nodulación

Para confirmar que los cósmidos aislados eran los responsables de la complementación, se repitió el test de nodulación. Los cuatro clones fueron de nuevo introducidos en los

derivados curados RSP900 y GMI9023, y los transconjugantes se usaron como inóculos en semillas de P. vulgaris (frijol).

Mientras que los cósmidos pCV38, pCV117 y pCV61 devolvieron a las estirpes Nod⁻ la capacidad noduladora de la silvestre, sorprendentemente, pCV65 fue incapaz de inducir la formación de nódulos. El ensayo de nodulación se repitió dos veces, obteniéndose los mismos resultados.

Morfológicamente, los nódulos formados en frijol por los transconjugantes de RSP900 o GMI9023 conteniendo pCV38, pCV117 o pCV61, fueron muy similares a los inducidos por la estirpe silvestre CIAT899 (Fig. 11), incluso muchos de ellos poseían un color rosado, indicativo de la producción de leg-hemoglobina y por tanto de la posible fijación de nitrógeno. Sin embargo, cuando se realizó el ensayo de fijación, todos los nódulos resultaron ser Fix⁻.

2.2.- Hibridación de los cósmidos solapados frente a los genes nod _____ comunes _____ de _____ R. _____ meliloti

Una vez aislada la región de nodulación de CIAT899, consideramos interesante investigar si los genes clonados presentaban homología con otras regiones nod pertenecientes a otras especies de Rhizobium. Para ello se eligieron los genes nod "comunes" de R. meliloti 41, que habían demostrado poseer un alto grado de conservación interespecífica (ver); estos genes, contenidos en un fragmento EcoRI de 8,5 kb (Materiales y Métodos, 2), se usaron como sonda radioactiva frente a una membrana de nylon que contenía los cósmidos

pCV38, pCV117, pCV61 y pCV65 digeridos con HindIII. Como se muestra en la Fig. 12, se obtuvieron señales de hibridación en las bandas HindIII de 21, 4, y 2,4 kb, lo que nos confirma la clonación de los genes deseados y la disposición de los fragmentos en el mapa, a la vez que nos demuestra una vez más la gran homología existente entre las regiones de nodulación de diferentes especies de Rhizobium.

Además, esto podría explicar el hecho de que pCV65 sea incapaz de complementar a los derivados curados, al faltarle dos de las bandas HindIII (4 y 2,4 kb) que hibridaron frente a la sonda nod de R. meliloti.

Por otra parte, considerando en conjunto los datos provenientes del test de nodulación y de la hibridación con la sonda nod de R. meliloti, la parte izquierda de la región clonada parece ser la posible candidata para contener los genes esenciales para las etapas tempranas de la nodulación.

2.3.- Extensión del rango de hospedador de R. meliloti y R. leguminosarum bv. trifolii por los cósmidos pCV38, pCV117 y pCV61.

Los plásmidos pCV38, pCV117 y pCV61 fueron transferidos a diversas estirpes de Rhizobium (Tabla VII), analizándose el fenotipo simbiótico de los transconjugantes obtenidos en plantas de frijol.

En todos los casos se detectaron nódulos en las plantas inoculadas, que fueron similares a los inducidos por CIAT899, tanto si se trataba de estirpes silvestres como de cepas

curadas de los plásmidos simbióticos (Fig. 13). No se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos con pCV38, pCV117 y pCV61, lo que parece razonable ya que su contenido genético es similar, esto es, son tres cósmidos solapados.

TABLA VIII. Estirpes de R. meliloti, R. leguminosarum bv. trifolii y R. leguminosarum bv. phaseoli a las que se transfirieron pCV38, pCV117 y pCV61^a

RECEPTOR ^b	DESCRIPCION
<u>R. meliloti</u> 102F43	silvestre, Nod ⁺ en alfalfa
<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>trifolii</u> RS1051	silvestre, Nod ⁺ en trébol
<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>trifolii</u> RS1043	derivado de RS1051 curado del plásmido Sym, Nod ⁻
<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CFN2001	derivado de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u> CFN42 curado del plásmido Sym, Nod ⁻

a.- Se utilizaron 20 plantas de frijol por ensayo, y otras tantas fueron inoculadas con 102F34, RS1051, RS1043, CFN2001, dejadas sin inocular, como controles negativos, o inoculadas con CIAT899, como control positivo. El ensayo de nodulación se realizó dos veces.

b.- También se usaron como receptores R. leguminosarum bv. phaseoli 8002, R. leguminosarum bv. viciae 300 y Rhizobium sp. NGR234; sin embargo estas estirpes revelaron ser capaces de nodular frijol, por lo que se tuvieron que eliminar del ensayo.

3.- DELIMITACION DE LA REGION NOD

3.1.- Organización física de pCV38

El mapa HindIII del cósmido pCV38 (ver Fig. 10), el mayor de los aislados en el experimento de complementación inicial, fue ampliado con los sitios de reconocimiento para las endonucleasas EcoRI, BamHI y BglII, que se eligieron por proporcionar, cuando se usan individualmente, un número no muy elevado de fragmentos.

El ADN de pCV38 se extrajo en maxi-escala y se purificó por un gradiente de CsCl-bromuro de etidio. El ADN se digirió con las enzimas arriba mencionadas, así como con sus posibles combinaciones dobles y las combinaciones de éstas con HindIII. Asimismo, y para confirmar la posición de los fragmentos, se realizaron cortes triples. La Figura 14 muestra los perfiles de restricción en uno de los geles utilizados en la resolución del mapa; otros geles, conteniendo los mismos cortes, fueron fabricados con una mayor (para detectar los fragmentos de ADN más pequeños) o una menor (con objeto de diferenciar bandas grandes de pesos moleculares semejantes) concentración de agarosa.

El mapa de restricción resultante se muestra en la Figura 15a.

3.2.- Subclonación de los fragmentos de pCV38 y ensayo de complementación en plantas de frijol

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el ensayo en plantas y de la hibridación con los genes nod, parece probable que sea en la parte izquierda de la región clonada donde se localicen los genes de CIAT899 responsables de la nodulación, ya que, pCV65, al que le falta esa parte, es incapaz de inducir la formación de nódulos.

Así pues, con objeto de localizar más precisamente la zona responsable de la complementación del fenotipo Nod⁻ de RSP900, y puesto que el cósmido pCV38 es el mayor de los aislados, se procedió a su subclonación, utilizando para ello el plásmido vector pRK404, que permite la selección de clones recombinantes por inactivación insercional del gen lacZ colocado detrás de su polilinker, lo que origina la pérdida del color azul en las colonias transformantes que han recibido el plásmido recombinante.

El cósmido pCV38 se digirió independientemente con las endonucleasas BamHI y HindIII; de los fragmentos resultantes, se electroeluyeron del gel y purificaron las bandas BamHI de 8 kb y HindIII de 2,4, 4,0 y 6,4 kb (esta última fue obtenida por digestión parcial y resulta de la suma de las bandas de 2,4 y 4,0 kb), ligándose posteriormente con T4 ligasa al vector pRK404 (previamente linearizado con BamHI o HindIII y tratado con fosfatasa alcalina con objeto de evitar autoligaciones). Las mezclas de ligación se usaron para transformar E. coli JM83, aislándose y analizándose el ADN plasmídico de

las colonias no azules.

Los subclones obtenidos se denominaron pCV3801 (pRK404:: 8 kb BamHI), pCV3802 (pRK404::2,4 kb HindIII), pCV3803 (pRK404::4,0 kb HindIII) y pCV3804 (pRK404::6,4 kb HindIII) (Fig. 15b); dichos subclones se introdujeron por conjugación triparental en el derivado curado RSP900, y los transconjugantes se ensayaron en test de nodulación para frijol.

Sóamente el subclón pCV3804 fue capaz de inducir la formación de nódulos en raíces de frijol (Fig. 16a); sin embargo, aunque el aspecto de éstos fue semejante al de los formados por CIAT899, el número de nódulos se redujo drásticamente con respecto a la estirpe silvestre.

Es particularmente intesante el hecho de que el cósmido pCV61 (al que le falta la banda HindIII de 2,4 kb) de lugar a un fenotipo Nod⁺, por lo que se pensó en la posibilidad de que algún gen (o genes) localizado en esas 2,4 kb poseyese otra copia funcional (o bien existiese otro gen funcionalmente equivalente) en la zona situada a la derecha de la región subclonada en pCV3804.

3.3.- Extensión del rango de hospedador de R. meliloti y R. leguminosarum bv. trifolii por el subclón pCV3804

De forma semejante a como se había realizado en el caso de los cósmidos pCV38, pCV117 y pCV61, el subclón pCV3804 fue analizado en su capacidad para extender el rango de hospedador de R. meliloti 102F34 y R. leguminosarum bv. trifolii

RS1051 a plantas de frijol, y para complementar a los derivados curados RS1043, CFN2001 y GMI9023.

Como se ilustra en las Figuras 16b, c, d y e, el cósmido pCV3804 fue capaz de conferir a todos los transconjugantes que lo habían recibido la capacidad de inducir nódulos en las raíces de frijol, aunque, y con respecto a la estirpe silvestre CIAT899, cuando los receptores fueron derivados curados el número de nódulos fue significativamente menor.

Estos resultados indican que en tan sólo 6,4 kb se localizan todos los genes necesarios para las etapas tempranas del proceso de nodulación, esto es, genes "comunes" y "específicos".

3.4.- Ampliación del mapa físico del subclón pCV3804

El ADN del plásmido pCV3804 fue extraído y purificado, y posteriormente digerido con la endonucleasa HindIII. Al igual que en el caso del cósmido pCV38, el grado de digestión fue controlado de forma que, además del vector, se originaran tres fragmentos: el mayor, de 6,4 kb, que resulta de la digestión parcial, y los otros dos fragmentos, de 4 y 2,4 kb, obtenidos por digestión total del ADN de pCV3804.

Los tres fragmentos HindIII obtenidos de esta forma se electroeluyeron del gel, se purificaron y se ligaron (con T4 ligasa) al vector pUC19 (previamente linearizado con HindIII y defosforilados sus extremos 5' con fosfatasa alcalina) originándose así los plásmidos pCV3805 (pUC19::2,4 kb

HindIII), pCV3806 (pUC19::4,0 kb HindIII) y pCV3807 (pUC19::6,4 kb HindIII) (Fig. 17b). El plásmido pUC19 es un vector capaz de replicar sólo en *E. coli*, pero que posee un alto número de copias, con lo que el ADN clonado se puede obtener en grandes cantidades; además, al igual que pRK404, contiene el gen lacZ de *E. coli* clonado detrás de su poli-linker, por lo que el sistema de selección, así como el análisis de los recombinantes se realizaron tal y como se explica en el apartado 3.2 de estos Resultados.

Los subclones pCV3805, pCV3806 y pCV3807 son, por tanto, equivalentes a pCV3802, pCV3803 y pCV3804, respectivamente, conteniendo el mismo fragmento de ADN proveniente de pCV38, pero insertado en dos diferentes tipos de vectores (ver Figs. 15 y 17).

Los ADNs de los subclones pCV3805, pCV3806 y pCV3807 se aislaron y purificaron, digiriéndose posteriormente con las restrictasas XhoI, EcoRV, ClaI, SalI y PstI, con sus combinaciones dobles y con las combinaciones de estas y HindIII; además, y para confirmar, se realizaron digestiones triples. Estos resultados, junto con los datos obtenidos de los cortes de pCV38, nos permitieron ampliar el mapa de la región de CIAT899 clonada en pCV3804 (pCV3807) para un total de nueve endonucleasas de restricción: HindIII, EcoRI, BamHI, BglII, XhoI, EcoRV, ClaI, SalI y PstI (Fig. 17a).

4.- ORGANIZACION GENETICA DE LA REGION nod DE LA ESTIRPE CIAT899 DE R. leguminosarum bv. phaseoli

El siguiente paso fue identificar, mediante el uso de sondas de ADN específicas, los genes contenidos en la región clonada de CIAT899; simultáneamente, y con la ayuda del mapa físico construido, se estableció la organización de dichos genes en la región de nodulación.

Para todos los experimentos de hibridación, se usaron membranas de nylon a las que previamente se habían transferido geles que contenían ADN total de la estirpe CIAT899 y de su derivado curado RSP900, así como del cósmido pCV38 y del subclón pCV3807. Los ADNs totales se digirieron con HindIII, (excepto cuando se hibridaron frente a nodE), pCV38 se cortó con HindIII, HindIII+ EcoRI y HindIII+BamHI, y pCV3804 fue digerido con varias combinaciones dobles y triples de las enzimas utilizadas para la elaboración del mapa físico (Fig. 18). Todas estas combinaciones se eligieron por proporcionar un conjunto de fragmentos que, a la vez que abarcaban la totalidad de la región clonada, eran lo suficientemente pequeños como para localizar de forma precisa las bandas de hibridación resultantes.

4.1.- Detección de nifH

Los genes estructurales de la enzima nitrogenasa (nifH, D y K) se han descrito ligados a los genes de la nodulación, en el plásmido Sym o en el cromosoma, y en algunos casos,

reiterados (ver Introducción 5.4.1); por otro lado, estos genes parecen estar muy conservados entre los microorganismos diazotróficos, por lo que los genes nif de una especie pueden utilizarse como sonda radioactiva para detectar los mismos genes en otra.

Basándonos en esto último, una de las membranas anteriormente descritas se hibridó frente al plásmido pCQ152, que contiene una secuencia intragénica de 300 pb del gen nifH de R. leguminosarum bv. phaseoli CFN42 (Materiales & Métodos, 2).

La única banda de hibridación detectada correspondió al ADN total de la estirpe CIAT899, siendo de 6,5 kb de tamaño. (Fig. 19). Como cabía esperar, no se encontró homología entre esta sonda y el ADN total del derivado curado RSP900; este resultado ratifica trabajos anteriores, en los que se describe a CIAT899 como un representante de la bv. phaseoli en el que los genes nif, localizados en el plásmido simbiótico, no se encuentran reiterados.

Por otro lado, la ausencia de señal en la región de nodulación clonada concuerda con el fenotipo Fix⁻ de los nódulos inducidos por los cósmidos aislados, por lo que el gen nifH debe estar localizado en otro lugar del pSym de la cepa CIAT899, pero no incluido en la región de nodulación definida por los cósmidos pCV38, pCV117 y pCV61.

4.2.- Detección de genes nod

Al igual que los genes nifHDK, los genes nod han demostrado estar muy conservados (a nivel de secuencia de nucleótidos) entre diferentes especies de rizobiáceas, homología que en el caso de algunos genes (los nod "comunes") va acompañada de equivalencia funcional, mientras que en el caso de otros (los genes nod "específicos") no se ha encontrado dicha equivalencia (ver Introducción 5.2).

Con objeto de definir la organización genética de la región clonada, se procedió a hibridar las membranas anteriormente descritas frente a sondas de genes nod previamente caracterizados: nodAB, nodC y nodD de R. meliloti, y nodIJ y nodE de R. leguminosarum bv. viciae (Materiales & Métodos). Con estas sondas se tiene una buena representación de los genes de nodulación; por una parte genes nod "comunes" (nodABCDEFGHIJ), por otra nod "específicos" (nodE), y finalmente, el gen regulador nodD, que a su vez también juega un papel muy importante en la especificidad de hospedador.

4.2.1.- Detección de nodAB

La Figura 20 ilustra los resultados obtenidos cuando los genes nodAB de R. meliloti se usaron como sonda radioactiva frente a uno de los filtros descritos. Tanto en el ADN total de la estirpe silvestre CIAT899 (carril 2) como en los carriles 3 y 4, correspondientes al cósmido pCV38, se obtuvo

hibridación en una sólo banda HindIII de 4 kb.

Los fragmentos HindIII-BamHI de 1,6 y 4,8 del clón pCV38 (carril 5), que también hibridaron frente a la sonda nodAB, corresponden a una banda contenida en la de 4 kb HindIII y a otra adyacente a esta última (ver mapa físico Figura 15a).

Por último, las bandas de hibridación encontradas en los carriles 6 al 15, que contenían el ADN del subclón pCV3807, nos revelaron más exactamente la situación de los genes homólogos a nodAB de R. meliloti, localizándolos en un fragmento HindIII-PstI de 1,6 kb, que está incluido en la banda HindIII de 4 kb.

4.2.2.- Detección de nodC

Como se muestra en la Figura 21, la misma banda HindIII de 4kb que hibridó frente a nodAB resultó ser homóloga al gen nodC de R. meliloti. Este hecho no fue de extrañar, ya que el gen nodC se sitúa en el mismo operón que nodAB en todas las especies estudiadas (ver Introducción 7.1).

La hibridación con la banda HindIII-BamHI de 2.4 kb, así como las señales obtenidas con los fragmentos correspondientes al plásmido pCV3807, indicaron que el gen homólogo a nodC se localizaba a la derecha de nodAB, concretamente en un fragmento PstI de 1,0 kb; dicho fragmento dió la señal más fuerte de las observadas en todos los experimentos de hibridación, indicando la existencia de una gran homología entre los genes nodC de R. meliloti y R. leguminosarum bv. phaseo-

li CIAT899.

4.2.3.- Detección de nodIJ

Cuando se usaron como sonda radioactiva los genes nodIJ de R. leguminosarum bv. viciae, no se detectó señal de hibridación alguna en el ADN correspondiente al subclón pCV3807; sin embargo, sí se encontró homología entre estos genes y la banda HindIII-BamHI de 4,8 kb contigua a la que hibridó con nodABC de R. meliloti, además de otro fragmento HindIII de 21 kb que incluye a la de 4,8 kb HindIII- BamHI (Fig 22).

Así pues, los genes nodIJ se localizan fuera de las 6.4 kb HindIII suficientes para la nodulación, pero muy cercanos a ésta, en un fragmento situado a la derecha de nodABC.

4.2.4.- Detección de nodD

Las estirpes 8002 y CE3, representantes del tipo I de R. leguminosarum bv. phaseoli, poseen tres copias del gen regulador nodD, además de tener reiterados los genes estructurales de la enzima nitrogenasa; por el contrario, CIAT899 sólo contiene una copia de los genes nifHDK y, tal y como se ilustra en la Figura 23, su gen nodD no está repetido.

Tanto en el ADN total de CIAT899 como en el del cósmido pCV38, una sola banda HindIII de 2,4 kb (incluida en el subclón pCV3807) hibridó frente a la sonda nodD de R. meliloti.

Con respecto al ADN de pCV3807, y dentro de la banda

HindIII de 2,4 kb, el fragmento más pequeño homólogo al gen nodD de R. meliloti fue uno EcoRI-HindIII de 0.6 kb, localizado a la izquierda de nodAB.

Por lo tanto, R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 sólo contiene un gen homólogo al nodD de R. meliloti, el cual está localizado en la región de nodulación clonada.

4.2.5.- Detección de nodE

Para la hibridación con la sonda nodE de R. leguminosarum bv. viciae, se usó una membrana en la que la única diferencia con las anteriores fue que los ADN totales se digirieron con HindIII+EcoRI.

Al igual que nodIJ, nodE no se localiza en la región de nodulación subclonada en pCV3807, sino que, a juzgar por las señales de hibridación, se encuentra en un fragmento EcoRI-HindIII de 1,9 kb, situado a aproximadamente 19 kb de los genes nodABC (Fig. 24).

Como resumen, la organización genética de la región de nodulación clonada, obtenida a partir de los experimentos de hibridación descritos, se muestra en la Fig. 25. Como se esperaba, en cada caso, las bandas de hibridación estuvieron representadas en el ADN total de CIAT899, mientras que no se detectaron señales de hibridación en el ADN total de su derivado curado RSP900; esto viene a confirmar la localización plasmídica de los genes de nodulación de R leguminosarum bv.

phaseoli CIAT899, previamente señalada por otros autores (Martínez y col., 1985; Brom y col., 1988).

5.- ENSAYOS EN OTRAS PLANTAS HOSPEDADORAS DE R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899

Las estirpes tipo II de R. leguminosarum bv. phaseoli, y entre ellas CIAT899, poseen un rango de hospedador amplio (Martínez y col., 1985), que les confiere la capacidad de nodular a otras leguminosas además de Phaseolus vulgaris (frijol), tales como Leucaena esculenta (leucaena) y Macroptilium atropurpureum (siratro). Por el contrario, las cepas tipo I de esta biovariedad tienen un rango de hospedador limitado (Martínez y col., 1985; Palacios y col., 1987); tal es el caso de la cepa CE3, que puede establecer simbiosis sólomente con plantas de P. vulgaris. Por ello, la estirpe CE3 fue elegida como receptora para estos experimentos de ampliación del rango de hospedador.

Los ensayos en otras plantas hospedadoras se realizaron en colaboración con la Unidad de Biología Molecular de Plantas y Biotecnología Vegetal de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México); en esta Unidad, y a partir de otra genoteca de ADN total de CIAT899 (Construida en el cósmido pSUP205), se había aislado un cósmido recombinante, pCV3820 (Fig. 26a), que contenía dos fragmentos EcoRI contiguos de 16 y 6,2 kb, y que había sido capaz de extender el rango de hospedador de la estirpe CE3 a plantas de leucaena, aunque no de complementar a la cepa curada RSP900 para nodular ninguno de

los hospedadores de CIAT899. Los dos fragmentos EcoRI de 16 y 6,2 kb de pCV3820 habían sido subclonados (también en el vector pSUP205), resultando los plásmidos pCV3821 y pCV3822, respectivamente (Fig. 26b); de ambos subclones, sólo pCV3822 había seguido manteniendo las propiedades de extensión de rango de hospedador de pCV3820 (Vargas y col., 1990)

5.1.- Hibridación de los ADNs totales de CIAT899 Y RSP900, y de los ADNs de pCV38 y pCV3807 frente a la región subclonada en pCV3822

Según se ha descrito anteriormente, la región de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 subclonada en pCV3804 es capaz de extender el rango de hospedador de R. meliloti y R. leguminosarum bv. trifolii hasta frijol. Por esta razón, se creyó interesante determinar si la misma región contiene la información para nodular a las otras dos plantas hospedadoras, leucaena y siratro, o si, por el contrario, existen diferentes regiones que se encuentran dispersas en el pSym, poseyendo cada una la información para nodular cada uno de los hospedadores de CIAT899.

En primer lugar, se quiso comprobar si la región de nodulación de CIAT899 aislada por nosotros (de 28,8 kb, clonada en el sitio HindIII del vector pVK102) incluía a la región aislada por el grupo mejicano (de 22,2 kb, clonada en el sitio EcoRI del vector pSUP205) o si, por el contrario, se trataba de dos zonas distintas del pSym de CIAT899, codificando

información, la primera para nodular frijol y la segunda para la nodulación de otra planta hospedadora, leucaena.

Para ello, el fragmento EcoRI de 6,2 kb del subclón pCV3822 se utilizó como sonda radioactiva frente a una membrana que contenía los ADNs totales de CIAT899 y RSP900 (cortados con la enzima HindIII), y ADNs de pCV38 y pCV3807 digeridos con varias endonucleasas de restricción (Fig. 27a). El resultado, que se ilustra en la Figura 27b, fue una fuerte hibridación positiva en la banda HindIII de 4 kb de los clones pCV38 y pCV3807 que había hibridado anteriormente frente a las sondas nodAB y nodC de R. meliloti, así como en otras bandas vecinas a ésta; además, dicha banda se encontró presente en el ADN total de CIAT899 pero no en el ADN total de RSP900.

En conclusión, se trata de la misma región, lo cual ya se sospechaba puesto que el plásmido pCV38 contiene dos fragmentos EcoRI precisamente de 6,2 y 16 kb de longitud (ver Fig. 15a). El hecho de que la región de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 clonada en el cósmido pCV3820 (EcoRI de 22,2 kb) sea incapaz de complementar al derivado curado RSP900, y que el subclón pCV3804 si lo sea, implica que la parte izquierda de pCV3804 (HindIII-EcoRI de 1,8 kb) es imprescindible al menos para la nodulación de plantas de frijol.

5.2.- Ensayos de extensión del rango de hospedador

Una vez establecido que ambos grupos estábamos trabajando con regiones de ADN solapadas, se procedió a realizar una serie de experimentos en plantas de Leucaena esculenta (leucaena) y Macroptilium atropurpureum (siratro), utilizando para ello varios de los subclones existentes, que se transfirieron a la estirpe CE3 y a tres derivados curados, RSP900 (curada de CIAT899), CFN2001 (curada de CE3) y A. tumefaciens GMI9023 (curada de C58), inoculándose los transconjugantes obtenidos en semillas germinadas de leucaena y siratro. La Tabla IX y las Figuras 28 y 29 ilustran los plásmidos utilizados y los resultados obtenidos en todos estos ensayos de ampliación del rango de hospedador. Como se observa en la Tabla IX, no hubo diferencias entre los resultados obtenidos a partir de los tests de nodulación en ambas plantas hospedadoras.

Cuando la estirpe CE3 fue la receptora, los plásmidos pCV38, pCV117 y pCV61 indujeron la formación de nódulos tanto en leucaena como en siratro, aunque éstos fueron pequeños y poco desarrollados (Fig. 28c). Por el contrario, los transconjugantes CE3(pCV3804) dieron lugar a nódulos similares a los formados por la estirpe silvestre CIAT899 (Fig. 28d), aunque, con respecto a éstos, su número fue menor. Además de pCV3804, otro subclón de pCV38, pCV3802, extendió el rango de hospedador de la estirpe CE3 hasta L. esculenta y M. atropurpureum, aunque se formaron escasos nódulos, y éstos fueron

TABLA IX. Fenotipo simbiótico, en plantas de leucaena y siratro, de los transconjugantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CE3 y RSP900, y de *A. tumefaciens* GMI9023, que han recibido los clones recombinantes pCV38, pCV117, pCV61, pCV3801, pCV3802, pCV3804, pCV3820, pCV3821 y pCV3822.

Clon introducido	Estirpe receptora ^a					
	CE3 Leuc. Sir.		RSP900 ^b Leuc. Sir.		GMI9023 Leuc. Sir.	
pCV38	+	+	+	+	+	+
pCV117	+	+	+	+	+	+
pCV61	+	+	+	+	+	+
pCV3804	+	+	+	+	+	+
pCV3820	+	+	-	-	-	-
pCV3821	-	-	-	-	-	-
pCV8822	+	+	-	-	-	-
pCV3801	-	-	NT ^c	NT	NT	NT
pCV3802	+	+	NT	NT	NT	NT

a.- Se utilizaron 20 plantas/ensayo de nodulación. Además de los transconjugantes, se inocularon tanto controles positivos (CIAT899), como negativos (CE3, RSP900, CFN2001 y GMI9023); asimismo, 10 plantas se dejaron sin inocular como control negativo de contaminación.

b.- Los resultados para CFN2001 fueron los mismos que para RSP900, por lo que no se reflejan en la Tabla.

c.- NT: los subclones pCV3801 y pCV3802 no se ensayaron sobre cepas curadas.

pequeños y poco desarrollados (Fig. 28e).

Los transconjugantes de CE3 con los clones pCV3820, pCV3821 y pCV3822 se ensayaron de nuevo en plantas de leucaena, y, por primera vez, en plantas de siratro. Los nódulos inducidos por pCV3820 fueron muy similares, en apariencia externa, a los formados por CIAT899, mientras que pCV3822 dio lugar a pocos nódulos, menos desarrollados que en el caso del plásmido pCV3820 y pCV3821 fue incapaz de inducir la formación de nódulos en cualquiera de las plantas hospedadoras.

Por otro lado, cuando se usaron como receptores las cepas curadas RSP900 y CFN2001, tanto pCV38 como pCV117 y pCV61 fueron capaces de mantener el amplio rango de hospedador de la estirpe silvestre CIAT899, aunque, con respecto a éstas, el número de nódulos fue menor (Figs. 29b y 30b).

Los transconjugantes de RSP900 y CFN2001 que habían recibido el subclón pCV3804 indujeron la formación de nódulos radicales en las plantas inoculadas, siendo éste el único de los subclones construidos capaz de inducir una respuesta de nodulación en una estirpe curada (Figs. 29c y 30c). Por tanto, la misma región de ADN de CIAT899 contiene información suficiente para la nodulación de los tres hospedadores.

Finalmente, la movilización de pCV38, pCV117, pCV61 y pCV3804 hasta *A. tumefaciens* GMI9023 originó transconjugantes capaces de formar pseudonódulos en la raíces de leucaena y siratro, siendo el resto de los subclones incapaces de inducir respuesta alguna por parte de GMI9023 (Fig. 29d).

Así pues, parece ser que la mínima información requerida

para ampliar el rango de hospedador de R. leguminosarum bv. phaseoli CE3 se encuentra en el plásmido pCV3802 (ver Fig. 25), y más concretamente en el fragmento EcoRI-HindIII de 0,6 kb que había mostrado homología con la sonda nodD de R. meliloti; nótese que tanto el subclón pCV3822 como pCV3802, que únicamente comparten ese fragmento de ADN, son capaces de extender el rango de hospedador de la estirpe CE3 hasta L. esculenta y M. atropurpureum.

6.- EL GEN nodD DE R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 COMO DETERMINANTE DE LA ESPECIFICIDAD DE HOSPEDADOR

Los experimentos realizados sugieren que la región de DNA de CIAT899 que hibrida con el gen nodD de R. meliloti es responsable de la extensión del rango de hospedador de la estirpe CE3 (tipo I), capacitándola para nodular plantas de leucaena y siratro. Por otro lado, ya se había demostrado que el subclón pCV3804 podía ampliar el rango de hospedador de R. meliloti y R. leguminosarum bv. trifolii hasta frijol, pero no se conocía exactamente que parte de pCV3804 era la responsable de este fenómeno.

Con objeto de dilucidar esta cuestión, los subclones pCV3820, pCV3821, pCV3822, pCV3801 y pCV3802 se movilizaron hasta R. leguminosarum bv. trifolii RS1051 y los transconjugantes obtenidos se inocularon en semillas germinadas de P. vulgaris (frijol). Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla X.

De la misma forma que extendieron el rango de hospedador

de la estirpe CE3 hasta leucaena y siratro, los subclones pCV3820, pCV3822 y pCV3802 (además de pCV3804) también confirieron a RS1051 la capacidad de nodular plantas de frijol; puesto que estos plásmidos sólo tienen en común el fragmento EcoRI-HindIII de 0,6 kb homólogo a nodD, parece ser que esta región es también la responsable para la extensión del rango de hospedador a plantas de P. vulgaris.

Por último, el transconjugante RS1051(pCV3802) se ensayó en plantas de leucaena y siratro; sin embargo, y a pesar de que esta cepa fue capaz de nodular frijol, el fenotipo en los otros dos hospedadores de CIAT899 fue Nod⁻, indicando que en este caso, la extensión del rango de hospedador requiere otros genes adicionales, no contenidos en el subclón pCV3802.

Tabla X. Fenotipo de plantas de P. vulgaris tras ser inoculadas con transconjugantes de RS1051 que contienen los plásmidos recombinantes pCV3820, pCV3821, pCV3822, pCV3801 y pCV3802.^a

Clon introducido	Fenotipo en <u>P. vulgaris</u>
pCV3820	Nod ⁺
pCV3821	Nod ⁻
pCV3822	Nod ⁺
pCV3801	Nod ⁻
pCV3802	Nod ⁺

^a Se inocularon 20 plantas/ensayo de nodulación; asimismo se realizaron controles de nodulación positivos (10 plantas inoculadas con CIAT899) y negativos (10 plantas sin inocular y otras 10 inoculadas con RS1051).

7.- ANALISIS DEL COSMIDO pCV61

Al analizar en conjunto todos los datos obtenidos hasta este punto, inevitablemente surge una notable contradicción: si la región de CIAT899 homóloga a nodD de R. meliloti puede extender el rango de hospedador de otras estirpes y hacer que nodulen las plantas hospedadoras de CIAT899, ¿por qué el cósmido pCV61, al que aparentemente le falta el gen nodD (ver Fig. 25) es capaz, no sólo de complementar a los derivados curados, sino también de conferir a otras estirpes silvestres la capacidad de nodular cualquiera de los hospedadores de R. leguminosarum bv. phaseoli?

La explicación más fácil podría ser que algún gen conte-

nido en pCV3802 (que es el clon más pequeño que confiere especificidad de hospedador) tuviese otra copia funcional en otra parte de la región de nodulación clonada; este gen podría ser incluso otro nodD, no habiéndose detectado en la primera hibridación por falta de homología con el de R. meliloti, pero que es capaz de reemplazar en sus funciones al nodD primeramente localizado.

Para intentar aclarar esta cuestión, el ADN del subclón pCV3805 (ver Fig 17) se digirió con HindIII+EcoRI y los dos fragmentos resultantes, de 1,8 y 0,6 kb de tamaño, se usaron como sondas radioactivas frente a membranas que contenían ADN del cósmido pCV38 (que a su vez incluye a pCV61) digerido con varias enzimas de restricción así como con algunas de sus combinaciones dobles. El resultado, ilustrado en las Figuras 31 y 32, fue, a excepción de los fragmentos que incluían a las bandas utilizadas como sondas, una falta total de homología entre éstas y el resto de la región clonada.

Así pues, en el plásmido pCV61 no parece existir una copia del gen homólogo a nodD de R. meliloti, ni de otro gen que estuviese contenido en pCV3802. A pesar de todo esto, este clon había mostrado repetidas veces su funcionalidad en los test de nodulación (Figs. 33 y 34), comprobándose que se trataba efectivamente del cósmido pCV61 antes y después de cada ensayo.

8.- ENSAYO PRELIMINAR DE LA FUNCIONALIDAD DEL GEN nodD DE R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899

Los resultados descritos demuestran que la región de CIAT899 hibrida frente al gen nodD de R. meliloti puede extender el rango de hospedador de otras estirpes de Rhizobium hasta las plantas hospedadoras de CIAT899. Por otro lado, se ha descrito que el gen nodD actúa como regulador positivo de los otros genes nod en conjunto con factores exudados por la planta (Innes y col., 1985; Mulligan y Long, 1985; Rossen y col., 1985).

A fin de determinar si la región clonada en pCV3802 posee un gen regulatorio nodD funcional, así como para intentar aclarar el comportamiento del cósmido pCV61, se procedió a realizar un ensayo preliminar cualitativo.

En este experimento, los clones pCV3804, pCV61 y pCV38 se movilizaron al derivado curado CFN2001, en el que previamente se había introducido el plásmido pMP154; este plásmido contiene el gen nodA de R. leguminosarum bv. viciae fusionado al gen informador lacZ, de forma que, en presencia de exudados de la planta (o de un flavonoide inductor apropiado, como la naringenina), la actividad β -galactosidasa (detectable por el color azul de las colonias en placas con Xgal) es indicativa de la inducción de la expresión de nodA por el gen regulador nodD (ver Introducción 4.3 y 7.2).

Para este ensayo se emplearon placas de medio TY adicionado de Xgal y naringenina, sembrando en ellas los transconjugantes obtenidos, así como la estirpe CFN2001(pMP154), como

control negativo de actividad inductora.

Tanto los transconjugantes de CFN2001(pMP154) que habían recibido pCV38 como los que contenían el subclón pCV3802 dieron lugar a colonias azules (indicativo de la producción de -galactosidasa); sin embargo, en este ensayo preliminar cualitativo no se pudo demostrar actividad inductora por parte del cósmido pCV61, cuyo comportamiento, a falta de un estudio más exhaustivo, permanece de momento sin aclarar.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados de los experimentos de la transferencia del plásmido pCV3802 a otras estirpes, la demostración de la actividad inductora por parte del ADN contenido en este subclón y la homología de su fragmento EcoRI-HindIII de 0,6 kb con el gen nodD de R. meliloti, parece razonable proponer que el gen nodD de R. leguminosarum bv. phaseoli está implicado en la especificidad de rango de hospedador.

V.- DISCUSSION

DISCUSION

Dentro del género Rhizobium, la genética bacteriana de la nodulación se ha analizado en mayor detalle en la especie R. meliloti y en las biovariedades viciae y trifolii de R. leguminosarum; en todas ellas, los genes nod se encuentran, junto con algunos genes nif y fix, en regiones relativamente pequeñas de su plásmido simbiótico (Downie y col., 1983; Schofield y col., 1983; Kondorosi y col., 1984).

Los genes de nodulación de R. leguminosarum bv. viciae y R. leguminosarum bv. trifolii se localizan en dos fragmentos de ADN de 10 kb y 14 kb, respectivamente (Downie y col., 1983; Schofield y col., 1984), en los que los diferentes genes se ordenan de forma continua; por ello, la transferencia de estas pequeñas regiones de ADN a otras especies de Rhizobium les confiere la capacidad de nodular el guisante y el trébol, respectivamente (Downie y col., 1983; Schofield y col., 1984). Sin embargo, en R. meliloti 41, estos genes se ordenan en dos grupos, separados por aproximadamente 6 kb (Kondorosi y col., 1984; Horvath y col., 1986), siendo necesaria la transferencia de ambos fragmentos para que la estirpe receptora adquiriera la capacidad de formar nódulos radicales en la alfalfa (Putnoky y Kondorosi, 1986).

En contraste con la profundidad que han alcanzado los estudios en las estirpes citadas anteriormente, es relativamente escasa la información disponible sobre los genes de nodulación de la bv. phaseoli de R. leguminosarum; en los representantes del tipo I, tales como la estirpe CE3, se sabe

que dos regiones del pSym, separadas por aproximadamente 20 kb, son esenciales para restaurar la capacidad de inducir nódulos en las raíces del frijol (Cevallos y col., 1989); estos datos, junto con los obtenidos por Lamb y col. (1985) y Vazquez y col. (sometido a publicación), sugieren que en el plásmido Sym de las cepas del tipo I de R. leguminosarum bv. phaseoli, existen al menos dos fragmentos separados que son requeridos para la inducción y el desarrollo de los nódulos.

Con el propósito de comparar las regiones de nodulación de ambos tipos de estirpes de R. leguminosarum bv. phaseoli, en este trabajo de investigación se procedió a la clonación y caracterización de los genes nod de un representante del tipo II: R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899.

Nuestros datos indican que, a diferencia de los resultados obtenidos con la cepa CE3, R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 posee una sola región que contiene la información requerida para la nodulación de sus tres leguminosas hospedadoras (frijol, leucaena y siratro); además, la organización genética de ambas regiones es diferente: mientras que los genes nod de CIAT899 se ordenan de forma similar a los de R. meliloti y los de las bvs. viciae y trifolii de R. leguminosarum, en la estirpe CE3 se ha encontrado que el gen nodA está contenido en un fragmento EcoRI de 3.5 kb, localizado a unas 20 kb de los genes nodBC y nodD (Vazquez y col., sometido a publicación). Estas diferencias entre las regiones nod de ambas estirpes vienen a confirmar la gran divergencia existente entre los dos tipos de cepas de la bv. phaseoli de R. legumino-

sarum, y que ha sido demostrada en otros muchos aspectos (Piñero y col., 1988).

El primer paso para la clonación de la región de nodulación de CIAT899 consistió en la construcción de un banco de genes de dicha estirpe, el cual, una vez comprobada su calidad, se utilizó para complementar a los derivados curados RSP900 y GMI9023, aislándose por este procedimiento los cósmidos solapados pCV38, pCV61 y pCV117 (Fig.).

Dichos plásmidos, cuando se reintrodujeron en las mismas estirpes curadas, volvieron a inducir la formación de nódulos radicales en plantas de frijol y, por otra parte, mostraron hibridación frente a una sonda que contenía los genes nod "comunes" de R. meliloti 41; estos experimentos confirmaron la clonación de la región de nodulación (al menos para su principal hospedador, el frijol), a la vez que demostraron la existencia de una gran homología entre los genes de nodulación de R. meliloti y R. leguminosarum bv. phaseoli.

Por otro lado, el cósmido pCV65, que se aisló de los nódulos en el experimento de complementación inicial, fue incapaz de volver a inducir nodulación cuando se transfirió de nuevo a RSP900 y GMI9023, lo que indica que dicho cósmido, aunque comparte algunas de las bandas HindIII con los otros tres aislados, no posee toda la información necesaria para la nodulación, encontrándose dicha información precisamente en aquellas bandas ausentes en pCV65, de 4 kb y 2,4 kb de longi-

tud, que hibridaron frente a la sonda nodD de R. meliloti.

El hecho de que el cósmido pCV65 fuese inicialmente aislado de los nódulos, pero en experimentos posteriores se mostrara incapaz de inducir nodulación, podría explicarse por el aislamiento simultáneo de pCV65 con otro de los cósmidos a partir de transconjugantes que contenían ambos recombinantes, pudiéndose separar ambos cósmidos cuando fueron extraídos los ADNs de éstos, transformados en E. coli y vueltos a introducir en los derivados curados, que ahora sólo contendrían uno ellos.

Los nódulos formados en frijol por los transconjugantes de RSP900 y GMI9023 que contenían uno de los tres cósmidos solapados (pCV38, pCV61 o pCV117), fueron muy semejantes a los inducidos por la estirpe silvestre CIAT899, incluso muchos fueron rosados, indicativo de la producción de leghemoglobina; a pesar de esto, los ensayos de reducción de nitrógeno demostraron que dichos nódulos eran Fix⁻, lo que quiere decir que, aunque los cósmidos aislados contienen todos los genes necesarios para las etapas tempranas de la nodulación, no ocurre así con los genes responsables de la fijación; este hecho se confirmó en los experimentos de hibridación posteriores, en los que no se detectó señal de hibridación entre la región clonada y la sonda nifH de R. leguminosarum bv. phaseoli CFN42.

Así pues, aunque el pSym de CIAT899 contiene toda la información genética necesaria para la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, ésta no se encuentra totalmente incluí-

da en la región clonada, pudiendo estos genes de fijación estar dispersos en el pSym o, alternativamente, próximos a la región de nodulación aunque no incluidos en ella. En este sentido, la única región clonada que contiene toda la información necesaria para la nodulación y la fijación de nitrógeno ha sido descrita por Innes y col. (1988), que demostraron que la inducción de nódulos fijadores en plantas de trébol requiere únicamente 32 kb del plásmido simbiótico de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843, en las que se han localizado todos los genes *nod* de ANU843 conocidos, sus genes estructurales de la enzima nitrogenasa *nifHDK* y genes homólogos a los genes *fixABC*, *nifA*, *nifB*, *nifE* y *nifN* de otras bacterias fijadoras de nitrógeno.

Una vez clonada la región de nodulación de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899, y con el objeto de delimitar dicha región, se procedió a la subclonación del plásmido pCV38 (el mayor de los aislados), ensayando los subclones resultantes en su capacidad para complementar el fenotipo Nod⁻ del derivado curado RSP900.

El resultado fue que sólo uno de los subclones, pCV3804, fue capaz de inducir la formación de nódulos por parte de la estirpe RSP900. Este plásmido, al igual que los cósmidos pCV38, pCV61 y pCV117, no sólo confirió a cualquiera de los derivados curados la capacidad de nodular plantas de frijol, sino que también fue capaz de extender el rango de hospedador de dos estirpes silvestres de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* hasta dicho hospedador; estos resultados indican

que en tan sólo 6,4 kb del plásmido simbiótico de la estirpe CIAT899 (clonadas en pCV3804) se localizan todos los genes necesarios para las etapas tempranas del proceso de la nodulación, esto es, genes nod "comunes" y "específicos", y ambos grupos son funcionales en R. meliloti y R. leguminosarum bv. phaseoli.

Esta extensión del rango de hospedador de R. leguminosarum bv. trifolii y A. tumefaciens también se ha observado por parte de las regiones de nodulación de otras especies (Hirsch y col., 1985; Putnoky y Kondorosi, 1986; Ramakrishnan y col., 1986; Nayadu y Rolfe, 1987; Rodriguez-Quiñones y col., 1989); sin embargo, no todas las regiones de nodulación clonadas han logrado extender el rango de hospedador de R. meliloti, como es el caso de la región nod de R. leguminosarum bv. trifolii (Fischer y col., 1985; Innes y col., 1987), indicando una dominancia de los genes nod "específicos" de R. meliloti sobre los de R. leguminosarum bv. trifolii; por el contrario, la región aislada de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899, al igual que la de la estirpe CE3 de esta misma biovariedad, (Cevallos y col., 1989) o de Rhizobium sp. NGR234 (Lewin y col., 1987) extendió el rango de hospedador de R. meliloti hasta frijol, lo que sugiere que esta dominancia de los genes "específicos" de R. meliloti podría estar restringida sólo a algunas especies de Rhizobium.

El aspecto externo de los nódulos inducidos por los tres cósmidos solapados y por el subclón pCV3804 fue similar al de los formados por la estirpe silvestre CIAT899; no obstante se

observó una diferencia, en aquellas plantas inoculadas con cualquiera de los derivados curados que habían recibido el plásmido pCV3804, el número de nódulos se redujo drásticamente con respecto a los inducidos por CIAT899 o los cósmidos pCV38, pCV61 o pCV117, lo que indica que, aunque la mínima cantidad de ADN clonado necesario para complementar a un derivado curado está representada por el subclón pCV3804, otros genes implicados en la nodulación deben estar presentes en el cósmido pCV38, pero fuera de la región incluida en el subclón pCV3804. Esto último se confirmó cuando, con el objeto de definir la organización genética de la región de CIAT899 clonada, ésta se hibridó frente a varios genes nod previamente caracterizados, encontrándose homología con los genes nodAB, nodC y nodD de R. meliloti (para todos ellos en el ADN contenido en el subclón pCV3804), y nodIJ y nodE de R. leguminosarum bv. viciae, que se localizaron fuera de la región subclonada en pCV3804.

Los trabajos dedicados al estudio de los genes nodIJ y nodE han demostrado que las mutaciones en los genes nodIJ conducen a un fenotipo de nodulación retrasada (Djordjevic y col., 1985; Evans y Downie, 1986), mientras que el gen nodE está implicado en la especificidad de hospedador y sus mutaciones afectan al desarrollo del cordón de infección y dan lugar a un retraso en la nodulación del hospedador específico (Shearman y col., 1986); basándonos en estos datos, no parece probable que el fenotipo producido por los derivados curados en los que se introdujo el subclón pCV3804 sea debido

a la ausencia de secuencias homólogas a los genes nodIJ o nodE; es posible por consiguiente, que otros genes todavía no identificados, pero presentes en el cósmido pCV38, aumenten la eficiencia de nodulación. En este sentido, cabe mencionar que las mutaciones en el gen nodL, descrito en las biovariedades viciae y trifolii de R. leguminosarum, dan lugar a una reducción significativa del número de nódulos en algunas plantas hospedadoras (Surin y Downie, 1988), por lo que pudiera ser que este gen también estuviese representado en la región de nodulación de la biovariedad phaseoli.

Con respecto a la organización genética de la región nod de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899, nuestros datos indican que en esta estirpe la ordenación de los genes nodDABCIJ es muy similar a la encontrada en R. meliloti y en las bvs. viciae y trifolii (ver Fig. de la Introducción). A diferencia de los representantes del tipo I de R. leguminosarum bv. phaseoli, que poseen tres copias del gen regulatorio nodD (Cevallos y col., 1989), en CIAT899 la hibridación frente al gen nodD de R. meliloti reveló una sólo banda EcoRI-HindIII de 0,6 kb y localizada adyacente a los genes nodABC en una posición equivalente a la descrita en otros rizobios; sin embargo, el fragmento homólogo al gen nodE se localizó a aproximadamente 19 kb de los genes nodABC, la cual es una distancia inusualmente larga si se compara con otras especies de Rhizobium (ver Introducción).

Mientras que las estirpes de R. leguminosarum bv. phaseoli tipo I (como CE3) sólo nodulan el frijol,

CIAT899 es capaz de infectar no solo a su hospedador original, Phaseolus vulgaris (frijol), sino también a otras plantas leguminosas tales como Leucaena esculenta (leucaena) y Macroptilium atropurpureum (siratro). Por ello, y en tercer lugar, resultó interesante determinar si la región de CIAT899 clonada era suficiente para la nodulación de los tres hospedadores o si, por el contrario, existían varias regiones dispersas por el plásmido Sym, cada una codificando información para la nodulación de una planta; estos experimentos se realizaron en colaboración con la Unidad de Biología Molecular de Plantas y Biotecnología Vegetal de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México), por lo que además se utilizaron tres clones construidos en dicha unidad (ver apartado 5 de Resultados).

Los resultados obtenidos indican que CIAT899 posee una sola región en su plásmido simbiótico que codifica información para la nodulación de sus tres plantas hospedadoras; esta región, contenida en el subclón pCV3804, es suficiente para complementar a cualquiera de las cepas curadas de Rhizobium que se ensayaron, aunque el número de nódulos se reduce con respecto a la estirpe silvestre CIAT899. Ninguno de los otros subclones ensayados fue capaz de inducir la formación de nódulos por parte de los derivados curados (aunque sí lo hicieron los cósmidos pCV38, pCV61 y pCV117), ni siquiera los clones pCV3820 o pCV3822 (los cuales solapan parcialmente con pCV3804), lo que sugiere que el fragmento HindIII-EcoRI de 1,8 kb localizado en la parte izquierda del plásmido pCV3804

(y ausente en pCV3820 y pCV3822) es esencial para la nodulación de las tres plantas hospedadoras, frijol, leucaena y siratro; no obstante, la información codificada por dicha región debe también estar presente en R. leguminosarum bv. trifolii (ya que pCV3822 la capacita para nodular frijol) y en R. leguminosarum bv. phaseoli CE3 (ya que pCV3822 la capacita para nodular leucaena y siratro).

Por otro lado, cuando se introdujeron en A. tumefaciens GMI9023 los clones pCV38, pCV61, pCV117 y pCV3804, los transconjugantes tan sólo lograron inducir la formación de pseudonódulos en plantas de leucaena y siratro, en contraste con los nódulos inducidos en plantas de frijol, que fueron similares a los formados por la estirpe silvestre; parece pues que existe información genética adicional, bien en el cromosoma, bien en el otro plásmido de CIAT899, necesaria para una nodulación efectiva de los hospedadores leucaena y siratro.

Una característica interesante fue el hecho de que la apariencia externa de los nódulos formados en los hospedadores leucaena y siratro resultó ser dependiente de la estirpe de Rhizobium receptora: mientras que los nódulos inducidos por los transconjugantes CE3(pCV3804) fueron grandes y bien desarrollados, similares a los formados por CIAT899, los transconjugantes de CE3 con los cósmidos pCV38, pCV61 o pCV117 dieron lugar a nódulos pequeños y poco desarrollados en ambas plantas hospedadoras; sin embargo, cuando el receptor fue una estirpe de Rhizobium curada (RSP900 o CFN2001),

se

observó el fenotipo opuesto, los transconjugantes con los cósmidos pCV38, pCV61 o pCV117 formaron nódulos grandes y desarrollados mientras que el subclón pCV3804 sólo fue capaz de inducir las mismas estructuras que las formadas por los transconjugantes CE3(pCV38), CE3(pCV61) o CE3(pCV117).

Todo esto sugiere que la información genética contenida en el pSym de la estirpe CE3, pero ausente en los derivados curados, está interfiriendo con la contenida en los cósmidos recombinantes para nodular los hospedadores heterólogos de la estirpe CE3, leucaena y siratro.

A este respecto, no es la primera vez que se describe que los genes que influyen en el rango de hospedador de especies o biovariedades diferentes pueden interferir si estos se encuentran juntos. Cuando el pSym de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se introdujo en una cepa de la bv. *phaseoli*, los transconjugantes produjeron muy pocos nódulos en guisante, pero las bacterias aisladas a partir de estos nódulos pudieron volver a nodular el guisante normalmente; estas bacterias se analizaron, encontrándose que habían perdido el plásmido simbiótico de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* o bien éste había sufrido grandes deleciones (Johnston y col., 1982), así, algunos genes del pSym de la bv. *phaseoli* impiden a la cepa "híbrida" nodular el guisante, incluso cuando el pSym de la bv. *viciae* introducido contiene toda la información necesaria para la nodulación de este hospedador.

En otros ejemplos más concretos, las mutaciones en el

gen nodE de R. meliloti capacitan a esta especie para producir la curvatura del pelo radical del trébol, aunque los mutantes son incapaces de formar cordones de infección ni nódulos (Debellé y col., 1986). Asimismo, para las biovariedades viciae y trifolii de R. leguminosarum, el operón que contiene los genes nodFE parece ser muy importante en la especificidad de hospedador: Djordjevic y col. (1985) demostraron que los mutantes en el gen nodE de R. leguminosarum bv. trifolii son capaces de nodular plantas de guisante; en línea con estos resultados, Spaink y col. (1989) indicaron que el producto del gen nodE es el principal factor que determina el rango de hospedador de R. leguminosarum bvs. trifolii y viciae, lo que por otra parte coincide con los resultados de Surin y Downie (1989), los cuales sugirieron que la proteína NodE de R. leguminosarum bv. viciae podría antagonizar la nodulación del trébol por la bv. trifolii, y viceversa, el producto del gen nodE de la bv. trifolii modula negativamente la nodulación del guisante por R. leguminosarum bv. viciae.

A este respecto, cabe indicar que el fragmento de ADN homólogo al gen nodE se localiza en el cósmido pCV38 pero fuera de la región subclonada en el plásmido pCV3804, por lo que pudiera ser que el gen nodE de la estirpe CE3 de la bv. phaseoli esté regulando negativamente la capacidad inductora de los cósmidos pCV38, pCV61 y pCV117 para la nodulación de los hospedadores heterólogos leucaena y siratro.

Parece claro, entonces, que la presencia de los genes de especificidad "equivocados" pueden inhibir la nodulación.

Conceptualmente, este fenómeno se parece al de la avirulencia en interacciones planta-patógeno; existen muchos ejemplos en los que una determinada estirpe de bacteria, virus u hongo es incapaz de inducir una enfermedad, no porque haya perdido alguna propiedad, sino porque contiene un gen dominante que hace que sea reconocido y rechazado por el potencial hospedador ().

Con respecto a la contradicción que se origina por los resultados obtenidos con el cósmido pCV61, al que, faltándole la región que hibrida con nodD es capaz de extender el rango de hospedador de otras estirpes de Rhizobium hasta plantas de frijol, leucaena y siratro, una vez demostrado que no existe homología entre este cósmido y el ADN contenido en el subclón pCV3802, sólo nos cabe apuntar la posibilidad de que exista un gen(es) funcionalmente equivalente, aunque no detectable por hibridación; este hipotético gen debería realizar entonces las funciones del gen nodD, al menos en su aspecto regulatorio, y quizás también en sus propiedades como determinante de la especificidad de hospedador.

Aunque en el ensayo preliminar de capacidad inductora el cósmido pCV61 dio un resultado negativo, hay que resaltar que se trataba de un ensayo cualitativo, siendo necesaria su repetición de forma cuantitativa (en medio líquido); alternativamente, podría ser posible que el hipotético gen regulador contenido en el cósmido pCV61 no respondiese al inductor ensayado, la naringenina, pero si lo hiciera a otra moléculas presentes en los exudados de las tres plantas hospedadoras.

Así pues, se hace necesario un estudio más profundo a fin de aclarar el particular comportamiento de este cósmido.

Por otro lado, cabe citar que este no es el único caso descrito en el que un plásmido, al que aparentemente le falta el gen regulatorio nodD es capaz de inducir nodulación; más concretamente, el plásmido pSM927, que se aisló a partir de un banco de genes de la estirpe CE3 de R. leguminosarum bv. phaseoli, carece de la zona que hibrida con el gen nodD de R. meliloti y es capaz de complementar a un derivado curado para nodular plantas de frijol (Cevallos y col., 1989).

Finalmente, nuestros resultados demuestran que la mínima cantidad de ADN clonado necesario para extender el rango de hospedador de la estirpe CE3 hasta leucaena y siratro, y de la cepa RS1051 hasta frijol, está representada en el subclón pCV3802; además, y puesto que tanto este subclón como pCV3822 fueron capaces de ampliar los rangos de hospedador de las estirpes citadas, es probable que el gen (o los genes) requeridos para esta ampliación de rango se localicen en el fragmento común a ambos plásmidos, banda que resultó homóloga al gen nodD de R. meliloti. Por otra parte, en un ensayo preliminar, la región de ADN contenida en el subclón pCV3802 demostró capacidad inductora del promotor nodA de R. leguminosarum bv. viciae. En conclusión, todos estos datos nos llevan a proponer que la región de CIAT899 homóloga al gen nodD de R. meliloti está implicada en la especificidad de hospedador.

Actualmente es un hecho reconocido que el gen nodD,

además de su función reguladora, pueda ser un determinante de la especificidad de hospedador (Horvath y col., 1987; Spaik y col., 1987; Honma y Ausubel, 1987; Györgypal y col., 1988), probablemente como el resultado de su interacción específica con los flavonoides de las plantas hospedadoras.

Así pues, parece ser que, al igual que ocurre con los genes nodD de las estirpes tropicales de Rhizobium MPIK3030 y NGR234 (Horvath y col., 1987; Bassam y col., 1988), el gen nodD de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 puede extender la capacidad de nodulación de otras estirpes de Rhizobium hasta sus plantas hospedadoras, posiblemente debido a que tiene unos requisitos poco exigentes en cuanto a los factores de la planta, siendo capaz de reconocer moléculas inductoras de los tres hospedadores.

Sin embargo, se necesita una caracterización más completa de este hipotético gen nodD con el objeto de determinar su preciso papel en la simbiosis. Por otro lado, no se puede excluir la posibilidad de que otros genes de CIAT899, tales como nodIJ, nodE u otros aún no identificados puedan influir en la especificidad; en este sentido, el hecho de que el transconjugante RS1051(pCV3802) sea capaz de nodular plantas de frijol pero no a los otros hospedadores leucaena y siratro, indica claramente la necesidad de otros genes adicionales, no contenidos en el subclón pCV3802. Las propiedades de amplio rango de hospedador de la estirpe NGR234 de Rhizobium pueden ser parcialmente explicadas por su único y funcional gen nodD; cuando este se transfiere a la estirpe ANU843 de

R. leguminosarum bv. trifolii, extiende su rango hasta varios de los hospedadores de NGR234, pero no a todos (Bassam y col., 1988), lo que indica que existen otros "loci" en el plásmido simbiótico de esta cepa, que codifican información para la nodulación de otros hospedadores, "loci" que además se encuentran dispersos en el plásmido Sym (Lewin y col., 1987; Nayadu y Rolfe, 1987).

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- A diferencia de las estirpes de Rhizobium leguminosarum biovariedad phaseoli tipo I, la cepa CIAT899 de R. leguminosarum bv. phaseoli (tipo II) posee una sólo región en su plásmido simbiótico, que contiene la información necesaria para la nodulación de sus tres plantas hospedadoras: Phaseolus vulgaris (frijol), Leucaena esculenta (leucaena) y Macroptilium atropurpureum (siratro).

- 2.- La organización de la región de nodulación de CIAT899 es muy similar, en cuanto a la ordenación de los genes nod "comunes", a la de las regiones nod de R. meliloti y de R. leguminosarum bvs. trifolii y viciae; no obstante, el gen "específico" nodE se localiza a aproximadamente 19 kb de nodABC, la cual es una distancia inusualmente larga si se compara con las regiones citadas anteriormente.

- 3.- Al igual que ocurre en las estirpes tropicales de amplio rango de hospedador Rhizobium sp. NGR234 y Rhizobium sp. MPIK3030, el gen nodD de R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 puede extender el rango de hospedador de otras especies hasta las plantas noduladas por CIAT899, probablemente porque es capaz de reconocer a las moléculas inductoras de los exudados de todas ellas. Por tanto, en la estirpe CIAT899 de R. leguminosarum bv. phaseoli, el gen nodD es un determinante importante de la especificidad de hospedador.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- APPELBAUM, E.R., McLOUGHLIN, T.J., O'CONNEL, M. y CHARTRAIN, N. Expression of symbiotic genes of Rhizobium japonicum USDA 191 in other rhizobia. J. Bacteriol. 163:385-38.
- BACHEM, C.W.B., BANFALVI, Z., KONDOROSI, E., SCHELL, J. y KONDOROSI, A. 1986.- Identification of host range determinants in the Rhizobium species MPIK3030. Mol. Gen. Genet. 203: 42-48.
- BAGDASARIAM, M., LURZ, R., RUCKERT, B., FRANKLIN, F.C.H., BAGDASARIAM, M.M., FREY, J. y TIMMIS, K.N. 1981.- Gene. 16: 237-247.
- BAL, A.K., SHANTHARAM, S. y RATNAM, S. 1978.- J. Bacteriol. 133: 1393-
- BANFALVI, Z., RANDHAWA, G.S., KONDOROSI, E., KISS, A. y KONDOROSI, A. 1983.- Construction and characterization of R-prime plasmids carrying symbiotic genes of R. meliloti. Mol. Gen. Genet. 189: 129-135.
- BANFALVI, Z., SAKANYAN, V., KONCZ, C., KISS, A., DUSHA, I. y KONDOROSI, A. 1981.- Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 184: 318-325.
- BARTH, P.T. y GRINTER, N.J. 1974.- J. Bacteriol. 120: 618-630.
- BARTH, P.T., TOBIN, L. y SHARPE, G.S. 1981.- En "Molecular Biology, Pathogenic and Ecology of Bacterial Plasmids". Levy, S.B., Clowes, R.C. y Koenig, E.L. (Eds.). pp 439-448. Plenum Press, Nueva York.
- BEYNON, J.L., BERINGER, J.E. y JOHNSTON, A.W.B. 1980.- Plasmids and host-range in R. leguminosarum and Rhizobium phaseoli. J. Gen. Microbiol. 120: 421-429.
- BOGUSZ, F., APPLEBY, C.A., LANDSMANN, J., DENNIS, E.S., TRINICK, M.J. y PEACOCK, W.J. 1980.- Haemoglobin genes in non-nodulating plants, and their expression in non-symbiotic tissue. Nature. 331: 178-180.
- BRADLEY, D.J., WOOD, E.A., LARKINS, A.P., GALFRE, G., BUTCHER, G.W. y BREWIN, N.J. 1988.- Isolation of monoclonal antibodies reacting with peribacteroid membrane and other components of pea root nodules containing Rhizobium leguminosarum. Planta. 173: 149-160.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V. 1979.- J. Gen. Microbiol. 112: 135 **
 BURNS, R.C. y HARDY, R.W.F. 1975.- "Nitrogen fixation in bacteria and higher plants". Springer Verlag. Nueva York.
- BUSHBY, H.V.A. 1982.- Ecology. En "Nitrogen Fixation. Vol 2:

Rhizobium". Broughton, W.J. (Ed.). pp 35-75. Clarendon Press, Oxford.

CAETANO-ANOLLES, G., CRIST-ESTES, D.K. y BAUER, W.D. 1988.- Chemotaxis of Rhizobium meliloti towards the plant flavone luteolin and dependence of functional nodulation genes. En "Nitrogen Fixation: Hundred Years After". Bothe, H., Bruijn, F.J. y Newton, W.E. (EDs.). p 460. Gustav Fischer, Stuttgart.

CALVERT, H.E., PENCE, M.K., PIERCE, M., MALIK, N.S.A. Y BAUER, W. 1984.- Anatomical analysis of the development and distribution of Rhizobium infections in soybean roots. Canadian Journal of Botany. 62: 2375-2384.

CASADESUS, C. y OLIVARES, J. 1979.- J.Bacteriol. 139: 316.

CAVIEDES, M.A., MEGIAS, M., GIL, A.M., PALOMARES, A.J. y RUIZ-BERRAQUERO, F. 1982.- Correlation between extracellular polysaccharide composition and nodulating ability in Rhizobium trifolii. Arch. Microbiol. 133: 20-22.

CHANDLER, M.R. 1978. Some observations on infection of Arachis hypogaea L. by Rhizobium. Journal of Experimental Botany. 29: 749-755.

CHANDLER, M.R., DATE, R.A. y ROUGHLEY, R.J. 1982.- Infection and root-nodule development in Stylosanthes species by Rhizobium. Journal of Experimental Botany. 33: 47-57.

CHEN, W.X., YAN, G.H. y LI, J.L. 1988.- Numerical Taxonomic study of fast-growing Soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to Sinorhizobium gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 392-397.

CHUA, K.Y., JARVIS, B.D.W., PANKHURST, C.E. y SCOTT, D.B. 1984.- Transposon mutagenesis and molecular cloning of symbiotic genes from Rhizobium loti. En "Advances in nitrogen fixation research". Veeger, C. y Newton, W.E. (Eds.). p 675. Nijhoff/Junk Publishers, The Hague, Netherlands.

CANTOR, C.R., SMITH, C.L. y MATHEW, M.K. 1988.- Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. Ann. Rev. Biophys. Chem. 17: 287-

COLEMAN, J., GREEN, P.J. y INOUE, M. 1984.- The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. Cell. 37: 429-

DAZZO, F.B. y TRUCHET, L. 1983.- Interactions of lectins and their saccharide receptors in the Rhizobium-legume symbiosis. J. Membr. Biol. 73: 1-16.

DITTA, G., SCHMIDHAUSER, T., YACOBSON, E., LU, P., LIANG, X. W., FINLAY, D.R., GUINEY, D. y HELINSKI, D.R. 1985.- Plasmid

related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and monitoring gene expression. *Plasmid*. 13: 149-153.

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 R. meliloti. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 7347-7351.

DJORDJEVIC, M.A., SCHOFIELD, P.R. y ROLFE, B.G. 1985.- Tn5 mutagenesis of Rhizobium trifolii host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. *Mol. Gen. Genet.* 200: 463-471.

DOWNIE, J.A., HOMBRECHER, G., MA, Q.S., KNIGHT, C.D., WELLS, B. y JOHNSTON, A.W.B. 1983.- Cloned nodulation genes of Rhizobium leguminosarum determine host-range specificity. *Mol. Gen. Genet.* 190: 359-365.

DREYFUS, B., ELMERICH, C. y DOMMARGUES Y. R. 1983.- Free-living Rhizobium strain able to grow under N₂ as the sole nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 711-713.

DREYFUS, B., ALAZARD, D. y DOMMERGES, Y.R. 1984.- Stem-nodulating Rhizobia. En "Current perspectives of microbial ecology". KLUG, M.G. y REDDY, C.E. (Eds.). pp 161-169. American Society for Microbiology, Washington DC.

DREYFUS, B., GARCIA, J. L. y GILLIS, M. 1988.- Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. 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 division induced in alfalfa roots by Rhizobium meliloti. *Planta*. 173: 289-301.

DUHOUX, E. 1984.- Ontogénèse des nodules caulinares du Sesbania rostrata (légumineuses). *Can. J. Bot.* 62: 982-994.

ECKHARDT, T. 1978.- A rapid method for the identification of plasmid DNA in bacteria. *Plasmid*. 1: 584-588.

ENGWALL, K.S. y ATHERLY, A.G. 1986.- The formation of R-prime deletion mutants and the identification of the symbiotic genes in Rhizobium fredii strain USDA 191. *Plant Mol. Biol.* 6: 41-

FARIA, S.M. De, HAY, G.T. y SPRENT, J.I. 1988.- Entry of rhizobia into roots of Mimosa scabrella Bentham occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2291-2296.

FARIA, S.M. De, McINROY, S. y SPRENT, J.I. 1987.- The occurrence of infected cells, with persistent infection threads, in

legume roots nodules. Canadian Journal of Botany. 65: 533-538.

FIGURSKI, D.H. y HELINSKI, D.R. 1979.- Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided "in trans". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1648-1652.

FINAN, T.M., HARTWIEG, E., LEMIEUX, K., BERGMAN, K., WALKER, G.C. y SIGNER, E. 1984.- J. Bacteriol. 159: 120-

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 R. meliloti that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell. 40: 869-877.

FLORES, M., GONZALEZ, V., BROM, S., MARTINEZ, E., PIÑERO, D., ROMERO, D., DAVILA, G. y PALACIOS, R. 1987.- Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp. J. Bacteriol. 169: 5782-5788.

FORRAI, T., VINCZE, E., BANFALVI, Z., KISS, G.B., RANDHAWA, G.S. y KONDOROSI, A. 1983.- Localization of symbiotic mutations in R. meliloti. J. Bacteriol. 153: 635-643.

FRIEDMAN, A.M., LONG, S.R., BROWN, S.E., BUIKEMA, W.J. y AUBEL, F.M. 1982.- Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of Rhizobium mutants. Gene. 18: 289-296.

GOTTFERT, M., LAMB, J.W., GASSER, R. SEMENZA, J. y HENNECKE, H. 1989.- Mutational analysis of the Bradyrhizobium japonicum common nod genes and further nod box-linked genomic DNA regions. Mol. Gen. Genet. 215: 407-415.

GOTZ, R. y SCHMITT, R. 1987.- Rhizobium meliloti swims by unidirectional, intermittent rotation of right-handed flagellar helices. J. Bacteriol. 169: 3146-3150.

GOVERS, F., NAP, J.P., KAMMEN, A. VAN, y BISSELING, T. 1987.-Nodulins in the developing root nodule. Plant Physiology and Biochemistry. 25: 309-322.

HAHN, M., MEYER, L., STUDER, D., REGENSBURGER, D. y HENNECKE, H. 1984.- Insertion and deletion mutations within the nif region of Rhizobium japonicum. Plant. Mol. Biol. 3: 159-

HALVERSON, L.J. y STACY, G. 1986.- Signal exchange in plant-microbe interactions. Microbiological Reviews. 50: 193-225.

HEFFRON, F., RUBENS, C. y FALKOW, S. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 3623-3627.

HENNECKE, H., ALVAREZ-MORALES, A., BETANCOURT-ALVAREZ, M.,

EBELING, S., FILSER, M., FISHER, H. M., GUBLER, M., HAHN, M., KALUZA, K., LAMB, J. W. MEYER, L., REGENSBURGER, B., STUDER, D. y WEBER, J. 1985.- Organization and regulation of symbiotic nitrogen fixation genes from Bradyrhizobium japonicum. En " Nitrogen Fixation Research Progress". Evans, H.J., Bottomley, y Newton, W. E. (Eds.). pp 157-163. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

HIGASHI, S. 1967.- Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium japonicum genome. J. Gen. Appl. Microbiol. 13: 391-403.

HOHN, B. 1979.- In vitro packaging of ****lambda**** and cosmid DNA. Methods Enzymol. 68: 299-309.

HOYKAAS, P.J.J., VAN BRUSSEL, A.A.N., DEN DULK-RAS, H., VAN SLOGTEREN, G.S.M. y SCHILPEROORT, R.A. 1981.- Sym plasmid of Rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and Agrobacterium tumefaciens. Nature. 291: 351-353.

IZANT, J.G. y WEINTRAUB, H. 1984.- Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. Cell. 36: 1007-

JACOBS, T.W., EGELHOFF, T.T. y LONG, S.R. 1985.- Physical and genetic map of a Rhizobium meliloti nodulation gene region and nucleotide sequence of nodC. J. Bacteriol. 162: 469-476.

JOHNSTON, A.W.B., BEYNON, J.L., BUCHANAN-WOLLASTON, A.V., SETCHELL, S.M., HIRSCH, P.R. y BERINGER, J.E. 1978.- High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. Nature. 276: 634-636.

JORDAN, D.C. 1984.- Rhizobiaceae. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1". Krieg, N.R. y Holt, J.G. (Eds.). pp 235-244. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

JORGENSEN, J.E., STOUGAARD, J., MARCKER, A. y MARKER, K.A. 1988.- Root nodule specific gene regulation: analysis of the soybean nodulin N23 gene promoter in heterologous symbiotic systems. Nucleic Acids Res. III 39-50

JULLIOT, J.S., DUSHA, I., RENALIER, M.H., TERZAGHI, B., GARNERONE, A.M. y BOISTARD, P. 1984.- An R-prime containing a 285 kb fragment of R. meliloti Sym megaplasmid: structural characterization and utilization for genetic studies of symbiotic functions controlled by pSym. Mol. Gen. Genet. 193: 17-

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, E., BANFALVI, Z. y KONDOROSI, A. 1984.- Physical

and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti: identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 193: 445-452.

KONDOROSI, A. y JOHNSTON, A.W.B. 1981.- The genetics of Rhizobium. En "The biology of the Rhizobiaceae". Giles y Atherly (Eds.). pp 191-224. Int. Rev. Cytol. Suppl 13.

KONDOROSI, A., KONDOROSI, E., PANKHURST, C.E., BROUGHTON, W.J. y BANFALVI, Z. 1982.- Mobilization of a R. meliloti megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and Agrobacterium. Mol. Gen. Genet. 188: 433-439.

KONIECZNY, A., SZCZYGLOWSKI, K., BORON, L., PRZYBYLSKA, M. y LEGOCKI, A. 1988.- Expression of lupin nodulin genes during root nodule development. Plant Science. 55: 145-149.

LAMB, J.W., DOWNIE, J.A. y JOHNSTON, A.W.B. 1985.- Cloning of the nodulation (nod) genes of Rhizobium phaseoli and their homology to R. leguminosarum nod DNA. Gene 34: 235-241.

LAMB, J.W., HOMBRECHER, G. y JOHNSTON, A.W.B. 1982.- Plasmid-determined nodulation and nitrogen fixation abilities in Rhizobium phaseoli. Mol. Gen. Genet. 186: 449-452.

LANCELLE, S.A. y TORREY, J.G. 1984.- Early development of Rhizobium-induced root nodules of Parasponia rigida. I. Infection and early nodule initiation. Protoplasma. 123: 26-37.

LEGOCKI, R.P., LEGOCKI, M., BALDWIN, T.O. y SZALAY, A. 1986.-

LEWIN, A., ROSENBERG, C., MEYER, H., WONG, C.H., NELSON, L., MANEM, J.-F., STANLEY, J., DOWLING, D.N., DENARIE, 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.

LINDSTROM, K. 1988.- Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 365-367.

LONG, S.R., BUIKEMA, W. y AUSUBEL, F.M. 1982.- Cloning of Rhizobium meliloti nodulation genes by direct complementation of Nod- mutants. Nature. 289: 485-488.

LUDWIG, R.A. 1987.- Gene tandem-mediated selection of coliphage lambda-receptive Agrobacterium, Pseudomonas, and Rhizobium strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 3334-3338.

MA, Q.S., JOHNSTON, A.W.B., HOMBRECHER, G. y DOWNIE, J.A. 1982.- Molecular genetics of mutants of Rhizobium leguminosa-

rum which fail to fix nitrogen. *Mol. Gen. Genet.* 187: 166-171.

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.

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.

MARVEL, D.J., TORREY, J.G. y AUSUBEL, F.M. 1987.- Rhizobium symbiotic genes required for nodulation of legume and nonlegume hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 1319-1323.

MEGIAS, M., CAVIEDES, M.A., PALOMARES, A.J. y PEREZ-SILVA, J. Use of plasmid R68.45 for constructing a circular linkage map of the Rhizobium trifolii chromosome. *J. Bacteriol.* 149: 59-64.

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.

MILLER, A.L., RAVEN, J.A., SPRENT, J.I. y WEISENSEEL, M.H. 1986.- Endogenous ion currents traverse roots and roots hairs of Trifolium repens. *Plant Cell and Environment.* 9: 79-83.

NAGAHARI, K. y SAKAGUCHI, K. 1978.- *J. Bacteriol.* 133: 1527-1529.

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.

NAYADU, M. y ROLFE, B.G. 1987.- Analysis of R-primes demonstrated that genes for broad host range nodulation of Rhizobium strain NGR234 are dispersed on the Sym plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 206: 326-337.

NOEL, K.D., SANCHEZ, A., FERNANDEZ, L., LEEMAN, J. and CEVALLOS, M.A. 1984.- *J. Bacteriol.* 158: 148-

OLSSON, J.E. y ROLFE, B.G. 1985.- Stem and root nodulation of the tropical legume Sesbania rostrata by Rhizobium strains ORS571 and WE7. *J. Plant Physiol.* 121: 199-210.

PALACIOS, R., FLORES, M., BROM, S., MARTINEZ, E., GONZALEZ, V., QUINTO, C., CEVALLOS, M.A. SEGOVIA, L., ROMERO, D., GAR-

CIARRUBIO, A., PIÑERO, D. y DAVILA, G. 1987.- Organization of the Rhizobium phaseoli genome. En "Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions". Verma, D.P. y Brisson, N. (Eds.). pp. 151-156. Martinus Nijhoff Publishers, Montreal.

PALOMARES, A.,

PIÑERO, D., MARTINEZ, E. y SELANDER, R.K. 1988.- Genetic diversity and relationships among isolates of R. leguminosarum bv. phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2825-2832.

RAMAKRISHNAN, N., PRAKASH, R.K., SHANTHARAM, S., DUTEAU, N.M. y ATHERLY, A.G. 1986.- Molecular cloning and expression of Rhizobium fredii USDA 193 nodulation genes: extension of host range for nodulation. J. Bacteriol. 168: 1087-1095.

ROGOWSKY, M.P., CLOSE, T.J., TAIT, R.C., HIRROKA, T., SHAW, J.J., CHIMERA, J.A. y KADO, C.I. 1986.- p3 congreso Montreal

ROLFE, B.G., DJORDJEVIC, M., SCOTT, K.F., HUGHES, J.E., BADE-NOCH-JONES, J., GRESSHOFF, P.M., CEN, Y., DUDMAN, W.F., ZURKOWSKI, W. y SHINE, J. 1981.- Analysis of the nodule forming ability of fast-growing Rhizobium strains. En "Current perspectives in nitrogen fixation". Gibson y Newton (Eds.). pp 142-145. Australian Academy of Science, Canberra, Australia.

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.

RUSSEL, P., SCHELL, M.G., NELSON, K.K., HALVERSON, L.J., SIROTKIN, K.M. y STACY, G. 1985.- Isolation and characterization of the DNA region encoding nodulation functions in Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol. 164: 1301-1308.

RUVKUN, G.B. y AUSUBEL, F.M. 1980.- A general method for site-directed mutagenesis in procaryotes. Nature. 289: 75-78.

SAPIENZA, C. y DOOLITTLE, W.F. 1982.- Unusual physical organization of the Halobacterium genome. Nature. 295: 384-

SCHOFIELD, P.R., RIDGE, R.W., ROLFE, B.G., SHINE, J. y WATSON, J.M. 1984.- Host-specific nodulation is encoded on a 14 kb DNA fragment in Rhizobium trifolii. Plant Mol. Biol. 3: 3-11.

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

SELVARAJ, G. y IYER, N. 1985.- A small mobilizable IncP plasmid vector packable into bacteriophage lambda capsids "in vitro". *Plasmid*. 13: 70-74.

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". Rodriguez, R.L. y Denhardt, D.T. (Eds.). pp 287-332. Butterworths, Boston.

SCHOLLA, M.H. y ELKAN, G.H. 1984.- Rhizobium fredii sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 484-486.

SCHOLZ, P., HARING, V., SCHERZINGER, E., LURZ, R., BAGDASARIAM, M.M., SCHUSTER, H. y BAGDASARIAM, M. 1985.- En "Plasmids in bacteria". Helinski, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A. y Hollaender, A. (Eds.). pp 243-259. Plenum Press, Nueva York.

SCOTT, D.B. y RONSON, C.W. 1982.- Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in Rhizobium trifolii. *J. Bacteriol.* 151: 36-

SHAN, S., SOUSA, S. y MODI, V.V. 1981.- *Arch. Microbiol.* 130: 262-

SIMON, R., PRIEFER, U. y PUHLER, A. 1983a.- A broad host range mobilization system for "in vivo" genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*. 1: 784-791.

SIMON, R., PRIEFER, U. y PUHLER, A. 1983b.- Vector plasmids for "in vivo" and "in vitro" manipulations of Gram-negative bacteria. En "Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction". Pühler, A. (Ed.). pp 98-106. Springer-Verlag, Berlin.

SKOGEN-HAGENSON, M.J. y ATHERLY, A.G. 1983.- High frequency induction of nodulation and nitrogen fixation mutants of Rhizobium japonicum. *J. Bacteriol.* 156: 937-

SMIT, G., KIJNE, J.W. y LUGTENBERG, B.J.J. 1987.- Involvement of both cellulose fibrils and a Ca⁺⁺-dependent adhesin in the attachment of R. leguminosarum to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* 169: 4294-4301.

SMITH, C.L., ECONOME, J., SCHUTT, A., KLEO, S. y CANTOR, C.R. 1987.- A physical map of the E. coli genome. *Science*. 236: 1448-

SO, J-S., HODGSON, A.L.M., HAUGLAND, R., LEAVITT, M., BANFALVI, Z., NIEUWKOOP, A.J. y STACY, G. 1987.- Transposon-induced

symbiotic mutants of Bradyrhizobium japonicum: isolation of two gene regions essential for nodulation. Mol. Gen. Genet. 207: 15-23.

SOBERON-CHAVEZ, G., NAJERA, R., OLIVERA, H. and SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. J. Bacteriol. 167: 487-

SPRENT, J.I. 1989.- Which steps are essential for the formation of functional legume nodules?. New Phytol. 111: 129-153.

SPRENT, J.I. y FARIA, S.M. DE. 1988.- Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. Plant and Soil. 110: 157-165.

TORO, N. y OLIVARES, J. 1986.- Analysis of R. meliloti sym mutants obtained by heat treatment. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1148-

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.

TSIEN, H.C., DREYFUS, B.L. y SCHMIDT, E.L. 1983.- Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of Sesbania rostrata. J. Bacteriol. 156: 888-897.

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.

VANCE, G.P., EGLI, M.A., GRIFFITH, T.H. y MILLER, S.S. 1988.- Plant regulated aspects of nodulation and nitrogen fixation. Plant Cell and Environment. 11: 413-427.

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.

VESPER, S.J. y BAUER, W.D. 1986.- Role of pili (fimbriae) in attachment of B. japonicum to soybeans roots. Appl. Environ. Microbiol. 52: 134-140.

VINCENT, J.M. 1980.- Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis. En "Nitrogen Fixation. Vol 2: Symbiotic associations and cyanobacteria". Newton, W.E. y Orme-Johnson, W.H. (Eds.). pp 103-129. University Park Press, Baltimore.

ZURKOWSKI, W. y LORKIEWICZ, Z. 1978.- Effective method for the isolation of non-nodulating mutants of Rhizobium trifolii. Genet. Res. 32: 311-314.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.^a CARMEN VARGAS MACIAS

titulada "CLONACIÓN, CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES DE LA MODULACIÓN DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM R.U. PAASEOLI CIAT 899"

acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE".

Sevilla, 16 de Octubre

1990

El Vocál,

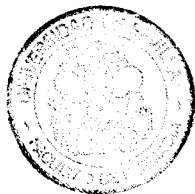
El Vocál,

El Vocál,

~~El Presidente~~

~~El Secretario,~~

~~El Doctorado,~~



DEPTO. DE MICROBIOLOGIA
Y
PARASITOLOGIA