

R. 6706

T 411

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

"SUBCLONACION DE LA REGION nod DE RHIZOBIUM TRIFOLII RS1051
Y SU MAPEO POR MUTAGENESIS CON Tn5"

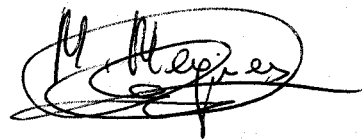
Memoria realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta D. MIGUEL FERNANDEZ-BURRIEL Y TERCERO para optar al Grado de Licenciado en Farmacia.

DIRECTOR



Dr. F. Rodríguez de Quiñones

DIRECTOR

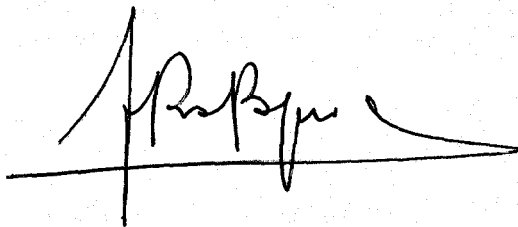


Prof. Dr. M. Megías Guijo

FRANCISCO RUIZ BERRAQUERO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO: Que el trabajo titulado: " Subclonación de la región nod de Rhizobium trifolii RS1051 y su mapeo por mutagénesis con Tn5", presentado por D. Miguel Fernández-Burriel Tercero para optar al grado de Licenciado, ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores D. Manuel Megías Guijo y D. Francisco Rodríguez de Quiñones.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Sevilla, a 30 de Agosto de 1987.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Ruiz Berraquero', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: F. Ruiz Berraquero

MANUEL MEGÍAS GUIJO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, Y FRANCISCO RODRIGUEZ DE QUIÑONES, DOCTOR EN FARMACIA Y BECARIO DEL MISMO DEPARTAMENTO,

C E R T I F I C A N : Que la Tesis de Licenciatura titulada "Subclonación de la región nod de Rhizobium trifolii RS1051 y su mapeo por mutagénesis con Tn⁵" presentada por D. Miguel Fernández-Burriel y Tercero para optar al Grado de Licenciado, ha sido realizada en este Departamento bajo nuestra dirección.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Sevilla, a 30 de agosto de 1987.



Fdo.: M. Megías Guijo



Fdo.: F. Rodríguez de Quiñones

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en la III Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. Mayo de 1987.

"...no somos más que la excrecencia de un protoplasma virtualmente inmortal y los fideicomisarios de una herencia destinada a sobrevivirnos..."

Sigmund Freud.

"Introducción al psicoanálisis".

A mi padre "in memoriam"

Es mi deseo hacer constar mi agradecimiento a las siguientes personas y entidades:

A D. Francisco Ruiz Berraquero, por permitirme trabajar en su laboratorio.

A G. Selvaraj por el vector pGS72.

A A. Leyva por la cepa C2110, el pRK2073, así como por sus sugerencias en el protocolo de mutagénesis.

A los departamentos de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia y de Genética de la Facultad de Biológicas por poner a mi disposición su instrumental y fondos bibliográficos.

Al Departamento de Microbiología y en especial al Dr. Ruiz-Sainz, por permitirme utilizar sus aparatos e instalaciones, sin los cuales no hubiese podido obtener muchos de los resultados de este trabajo, así como por su apoyo incondicional.

Al Dr. Megías, por su apoyo y codirección en este trabajo, que sin su ayuda no hubiese podido acabar.

A Marina, por tantas y tantas cosas...

Pero mi más sincero e intenso agradecimiento es para Paco, mi director, supervisor, compañero y amigo, por sembrar en mi esa inquietud, y hacer posible que este trabajo comenzase un día, consiguiendo que una parte de mis sueños se hicieran realidad.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS USADOS EN ESTA TESINA

At	<u>Agrobacterium tumefaciens</u>
Rme	<u>Rhizobium meliloti</u>
Rtr	<u>Rhizobium trifolii</u>
Rle	<u>Rhizobium leguminosarum</u>
pb	Pares de bases
Kb	Kilopares de bases
cpm	Cuentas por minuto
DO	Densidad óptica
Pm	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
PEG	Polietilén glicol
Fur	5-Fluoruracilo
Nal	Acido nalidíxico
Tc	Tetraciclina
Km	Kanamicina
Spc	Espectinomicina
Rif	Rifampicina
BSA	Albúmina sérica bovina
PVP	Polivinil-pirrolidona
SDS	Dodecil sulfato sódico
I.N.I.A.	Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias

INDICE

=====

INTRODUCCION.....	0
0.Objetivo.....	1
1.Taxonomía del género <u>Rhizobium</u>	3
2.La simbiosis <u>Rhizobium</u> -leguminosa.....	5
3.Genética de la simbiosis <u>Rhizobium</u> -leguminosas.....	7
4.Organización de los genes <u>nod</u>	11
5.Regulación de los genes <u>nod</u>	13
6.Mutagénesis dirigida con <u>Tn5</u>	17
MATERIALES Y METODOS.....	20
1.Bacterias y plásmidos.....	21
2.Plantas.....	21
3.Medios y condiciones de cultivo.....	21
4.Enzimas e isótopos.....	22
5.Antibióticos.....	22
6.Test de nodulación.....	23
7.Reaislamiento de bacterias a partir de nódulos.....	29
8.Análisis de perfil de plásmidos.....	29
9.Electroforesis en gel de agarosa.....	29
10.Recuperación del ADN a partir de los geles.....	30
11.Extracción y purificación de ADN.....	30
12.Obtención de derivados delecionados de pFR15.....	32
13.Mecanismos de transferencia de ADN.....	33
14.Hibridaciones de ADN.....	37
15.Marcaje de ADN.....	38
16.Subclonación.....	38
17.Mutagénesis dirigida.....	39
RESULTADOS.....	40
1.Estudio del rango de hospedador inducido por pFR14 y pFR15.....	41
2.Nodulación inducida por el plásmido recombinante pMFB1.....	43
3.Experimentos de reconstrucción con los derivados delecionados de pFR15.....	44
4.Hibridación contra la región <u>BglII</u> - <u>BglII</u> de 1,45 Kb de pFR1508.....	47
5. Fenotipo simbiótico de los mutantes pFR1508:: <u>Tn5</u>	49
DISCUSION.....	58
CONCLUSIONES.....	66

INTRODUCCION



0. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido enfocado al estudio en detalle de los genes implicados en los estadios tempranos de la nodulación de Rhizobium trifolii RS1051 clonados previamente en los cósmidos pFR14 y pFR15 (95).

Este estudio se ha basado en las siguientes consideraciones:

a) Importancia económica y en la agricultura del fenómeno de la simbiosis Rhizobium-leguminosas (84), puesto que , económicamente, la parte de la simbiosis que beneficia a la planta es de singular importancia, especialmente cuando es el nitrógeno uno de los nutrientes limitantes más decisivos (17).

b) La cepa RS1051 de R. trifolii está siendo estudiada en nuestro laboratorio a distintos niveles (95,76,20), con lo que en este estudio se trata de complementar nuestro conocimiento de la misma con datos referentes a la organización y distribución de una parte de su genoma , por otra parte de gran importancia por su relación directa con el fenómeno simbiótico .

c) Hay, además, precedentes de la existencia de diferencias marcadas respecto a la cepa de R. trifolii más estudiada, ANU843 (108). Entre estas, cabe destacar, la existencia de dos copias del gen nodD en RS1051 (44), mientras que sólo existe una en ANU843 (28 , 41). Por otra parte, mientras que la región nod clonada de ANU843, es capaz de inducir nodulación en trébol de la especie NGR234 (4 , 108), resultados de experimentos previos (95), y confirmados

en este trabajo, demuestran que tanto pFR14 como pFR15 son incapaces de aumentar el rango de hospedador de NGR234 a trébol.

d) Este es, en todo caso, un estudio comparativo de las dos cepas de R. trifolii, ANU843 y RS1051, en lo que se refiere a las regiones de su genoma que codifican las etapas tempranas de la nodulación.

1. TAXONOMIA DEL GENERO RHIZOBIUM

Este género se encuentra en la 9ª edición del Manual de Bergey (1984) incluido en la Familia Rhizobiaceae, que además incluye a los géneros Bradyrhizobium, Phyllobacterium y Agrobacterium, diferenciándose en el tipo de planta en la que producen un proceso de nodulación o hipertrofia y en su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

El género Rhizobium agrupa a bacterias formadoras de nódulos en raíces de plantas leguminosas de zonas templadas. Dichos nódulos fijan nitrógeno atmosférico gracias a la colaboración de estas bacterias diferenciadas en el nódulo en bacteroides, células que no se dividen y están especializadas en la fijación de nitrógeno, colaboración que puede llegar a considerarse hasta cierto punto como altruista por parte de la bacteria.

La clasificación dentro del género Rhizobium se había venido haciendo únicamente según un criterio de infección basado en un hospedador distinto para cada especie (123). Actualmente y debido a los avances en genética y el consiguiente conocimiento del genoma bacteriano, así como por los tratamientos aplicados por la taxonomía numérica, se viene a desenmarañar la confusión creada por la aparición en este género de estirpes con amplio rango de hospedador y que son capaces incluso de nodular en plantas no leguminosas (1, 33, 118, 119).

Hoy día, R. meliloti sigue como especie separada, pero R. trifolii, R. phaseoli y R. leguminosarum, que nodulan en trebol, judía y guisante respectivamente, se consideran tres biovariedades de la misma especie: R. leguminosarum biovar trifolii, phaseoli y viciae respectivamente.

Han sido descritas asimismo, dos nuevas especies, R. loti (122) que nodula en altramuz y garbanzo, y R. japonicum, descrita por Keyser y col (59) que según la descripción original nodulaba sólo cultivares silvestres de soja pero no era capaz de formar nódulos efectivos (fijadores) en cultivares comerciales. Pero, han aparecido resultados recientes (15) que muestran la existencia de estirpes mejoradas capaces de fijar también en cultivares comerciales.

Los R. japonicum, se diferencian en dos grupos: los llamados de crecimiento rápido con un tiempo de generación inferior a 6 horas, que acidulan el medio donde crecen y que constituyen la especie R. fredii, y los de crecimiento lento con un tiempo de generación mucho mayor, que alcalinizan el medio en el que crecen, y que se separan en el nuevo género Bradyrhizobium japonicum (120).

Es conveniente señalar que mientras los términos aquí señalados de R. loti y el genérico Bradyrhizobium (para los rizobios de crecimiento lento) han sido ampliamente aceptados, no ha ocurrido lo mismo con la unificación de R. trifolii, R. phaseoli y R. leguminosarum y su sistematización en biovariedades, y preferimos en este trabajo y siguiendo el criterio general de los genetistas de Rhizobium, referirnos a la especie que ocupa nuestro interés como R.

trifolii y no como R. leguminosarum biovar trifolii.

2. LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

De acuerdo con las conclusiones del IV Congreso Internacional de Fotosíntesis (1977), la producción de leguminosas grano en todo el mundo, deberá incrementarse hasta llegar a unos 500 millones de toneladas a final de siglo (la producción actual es de 130 millones de toneladas) para poder suministrar las proteínas suficientes para las exigencias de la población que se prevee habrá en el año 2000.

Así, parece sensato prestar más atención a estas plantas, no sólo por su particular incidencia en la alimentación humana y animal, sino también por su relativa independencia de la fertilización nitrogenada. Tan especial comportamiento se debe a su capacidad de fijar nitrógeno molecular en simbiosis mutualista con Rhizobium.

Esta asociación simbiótica utiliza la luz como fuente de energía para llevar a cabo el proceso de reducción de nitrógeno a amoníaco, lo que supone un importante ahorro de combustibles fósiles necesarios para la fijación química por el proceso Haber-Bosch.

El establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa es un proceso de desarrollo complejo (46), en que rizobios activos reconocen primero, y se unen después a las raíces. Aunque no se conocen exactamente a nivel molecular los mecanismos necesarios para el establecimiento de la simbiosis, el inter

cambio de señales moleculares entre planta y rizobio ha demostrado ser necesario para el inicio, desarrollo y mantenimiento de la simbiosis (46, 32).

El reconocimiento, es probablemente un proceso debido no a un sólo paso, sino a la culminación de una cadena de eventos. Así, el fallo de rizobios homólogos o de plantas para reconocer y responder con rapidez a una señal molecular podría impedir el establecimiento de la relación simbiótica entre ambos (32).

Se ha sugerido que las lectinas de la plantas hospedadoras median en el reconocimiento y la unión de un Rhizobium específico por el polisacárido (también específico) de su pared celular(46)

Después de la unión del rizobio así reconocido a la superficie radicular, se produce una curvatura del pelo radical, que envuelve al microorganismo, paso que parece jugar un papel importante en el proceso de infección . El nuevo material sintetizado por la planta para su pared celular es utilizado ahora para construir una estructura tubular llamada cordón de infección, por el que, en fila india, penetran los rizobios al interior.

Las células corticales se dividen y diferencian en tejido nodular mientras las bacterias liberadas del cordón de infección se rodean de una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal, diferenciándose en bacteroides maduros capaces de cumplir su función fijadora.

Además, se ha demostrado que el establecimiento de un proceso acti-

vo de fijación requiere tanto de la presencia de productos originados por la planta(glutamina sintetasa y leghemoglobina) como por la bacteria (nitrogenasa, nodulinas) (32, 46, 45, 112).

Además del mecanismo antes señalado existe otra forma en la que los microorganismos pueden acceder a los meristemas de la planta para establecer su relación simbiótica , y sin la formación del cordón de infección (80). En este caso, las bacterias inician la infección en la base de los pelos radiculares, en las axilas de las raíces laterales emergentes, a través de los espacios que dejan las células epidérmicas y proliferan en los espacios intercelulares antes de invadir las células corticales; este proceso se conoce como "crack entry".

Aunque el proceso de nodulación está caracterizado por un alto grado de especificidad en la relación Rhizobium-leguminosa, esto es cierto sólo en las especies de crecimiento rápido con la excepción hecha de Rhizobium sp. NGR234 y R. meliloti L5-30, pues las especies de crecimiento lento del género Bradyrhizobium son promiscuas y pueden formar una simbiosis efectiva con un amplio rango de hospedadores.

3. GENETICA DE LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS

Hay tres factores fundamentales que han servido de pilares para la localización exacta de los genes simbióticos esenciales en multitud de cepas de Rhizobium:

- La homología entre los bien conocidos genes nif de Klebsiella pneumoniae y los de otros microorganismos fijadores de nitrógeno.
- El mapeo físico y genético de amplias regiones de los plásmidos simbióticos (pSym).
- El análisis de complementación de cepas defectivas con clones recombinantes.

Hasta ahora, entre los genes involucrados en el proceso simbiótico se han identificado:

A) Genes nod.- Involucrados en las etapas tempranas de la nodulación, y en los que hay que diferenciar los genes nod 'comunes', llamados así por el hecho de que pueden ser complementados con los homónimos de otro Rhizobium, y los genes que confieren la especificidad para el hospedador, llamados también hsn por algunos autores (49), mientras que otros autores consideran todos estos genes como nod sin distinción de ningún tipo (101, 109 , 111).

B) Genes nif.- Que codifican la enzima nitrogenasa y se encuentran reunidos en un operón (nifKDH) altamente conservado en los microorganismos fijadores de nitrógeno. Primeramente estudiado en Klebsiella pneumoniae (12, 14), ha demostrado estar presente en todos los microorganismos fijadores de nitrógeno tanto gramnegativos (Azotobacter, Rhizobium, Rhodopseudomonas), como grampositivos (Clostridium pasteurianum) y actinomicetos (Frankia).

La extraordinaria conservación del operón nifKDH, (104) sugiere un

intercambio o distribución del mismo entra las distintas especies fijadoras de nitrógeno en un tiempo relativamente reciente, según se deduce de estudios de secuenciación realizados en distintas especies como R. meliloti, Anabaena, Azotobacter, Clostridium y Klebsiella (116) . Estudios posteriores demostraron que estos genes, además, eran funcionales, debido a que eran expresados activamente en nódulos, lo que se demostró por hibridación de ARNm de nódulos con ADN de nif (22, 66).

Estos genes nifKDH, se hallan ligados a megaplásmidos en especies de crecimiento rápido (3, 47 ,81, 99), además de estar íntimamente ligados como unidad transcripcional simple (22) o reiterada (73, 87) y a su vez en proximidad física a los genes nod en los plásmidos simbióticos (2, 108, 49, 67).

En los casos de especies de crecimiento lento como R. japonicum, se sugiere su localización cromosómica , y tanto nifH como nifKD se encuentran en una sola copia por genoma y además están separados (58). Estos operones, lo mismo que los nod, están regulados, en este caso por la unidad nifA, que a su vez está regulada por el oxígeno (39, 40).

Genes fix.- Son genes de función no muy bien conocida y que no son nod ni nif pero que intervienen en el mantenimiento del nódulo y en su desarrollo posterior, puesto que las mutaciones en estos genes resultan indefectiblemente en un fenotipo Nod+ Fix- (55).

Estos genes han demostrado estar en mucho mayor número que los genes nod según análisis genéticos de varias especies de Rhizobium (8, 42, 71,

74). Algunos de estos genes han sido localizados y mapeados, encontrándose bien en la región nod-nif (34, 92) junto a los genes nod, en las especies de crecimiento rápido, todo ello localizado en plásmidos autóctonos de alto Pm, que por eso se han llamado plásmidos simbióticos (pSym)(44, 48, 64, 66, 85, 88,97).

Genes ndv.- También de función poco conocida, son un grupo de genes requeridos por los rizobios para el establecimiento de una relación simbiótica completa. Relacionados estructural y funcionalmente a los genes de Agrobacterium que afectan a la virulencia (y ubicados en dos loci cercanos del cromosoma denominados chvA y chvB)(35, 18)), han sido denominados ndvA y ndvB. Se ha visto que mutantes en estos genes dan lugar a la formación de 'nódulos' o estructuras pseudonodulares no invasivas, y que no contienen bacteroides ni cordones de infección (35).

Debido a la relación estructural y funcional entre ndv y chv, y que estos están involucrados en algún paso del proceso de síntesis del polisacárido de Agrobacterium (18) es posible que los genes ndv también estén relacionados con la síntesis de algún componente del polisacárido de Rhizobium, aunque los datos que se tienen actualmente no son del todo concluyentes (35).

Esta relación se acentúa con el hecho de que el polisacárido ha mostrado jugar un papel importante en la interacción planta-microorganismo (70) tanto en el caso de Rhizobium (121, 29) como en el de Agrobacterium (115,89) influyendo tanto en la patogenicidad de la última, como en la capacidad y posibilidad de desarrollo de la relación simbiótica en la primera.

4. ORGANIZACION DE LOS GENES NOD

Los genes nod y su organización, físico-genética han sido estudiados ampliamente en las especies de crecimiento rápido de Rhizobium (2, 41, 54, 67, 68, 96) siendo la especie R.meliloti la mejor conocida en la actualidad (41, 44, 49, 54, 67).

De estos estudios, tanto en esta especie como en otras de crecimiento rápido como R.trifolii, R.leguminosarum, Rhizobium sp. NGR234, se ha obtenido un modelo de organización génica, al parecer común para todas ellas. Así, por aislamiento de cósmidos recombinantes (91) y estudios físico-genéticos de los pSym correspondientes se han podido discernir dos grupos de genes relacionados con las etapas iniciales de la nodulación:

A) Genes nod agrupados en un bloque al que se da la denominación de región nod "común" y constituido por un grupo de cuatro genes agrupados en dos unidades transcripcionales y normalmente con direcciones opuestas, nodABC y nodD (117, 44). Los nodABC juegan entre otros un papel importante en la curvatura del pelo radical y los mutantes en esta zona exhiben un claro fenotipo Nod- (2, 27, 28). El gen nodD puede estar presente en una, dos o tres copias según la especie, de las que sólo una o dos son funcionales (28, 31, 41, 44, 96), determinándose esto porque las mutaciones en dichos genes conducían a un retraso en la nodulación o a un fenotipo Nod-(44). Las otras copias del gen nodD pueden encontrarse en el mismo replicón (pSym) o bien en otro distinto (49, 101, 44). Además, en R. leguminosarum se han descrito otros dos genes agrupados en la unidad transcripcional nodIJ (32, 38) y homólogos funcionalmente a la

region II de R. trifolii, cuyo estudio por intensa mutagénesis con In5 reveló su papel regulador negativo sobre los operones antes citados, así como en la formación del cordón de infección (31, 32, 108).

También en Rle 248, Rtr ANU843, Rhizobium sp MPKI3030, el estudio detallado de los genes nod indica una organización similar entre ellos y con R. meliloti (2, 107, 79). Además, al estudiar la homología entre las distintas especies, se ha observado un alto grado de conservación de estos genes así llamados 'comunes' (96, 103).

B) Genes nod, que agrupados en un segundo bloque también constituido por cuatro genes en dos unidades transcripcionales, según se desprende de datos de secuenciación(49), influyen en la especificidad para el hospedador, son llamados genes hsn por algunos autores (49, 54, 117), mientras otros autores siguen de nominándolos como nodEFGH, y que se corresponden con la regiones III y IV de R. trifolii ANU843 (100, 108, 111).

Según el estudio detallado de estos genes realizado en R. meliloti, también presenta dos unidades transcripcionales hsnABC (nodEFG) y hsnD (nodH), también con direcciones opuestas(49). Sólo los mutantes en hsnD muestran un fenotipo Nod- mientras que los mutantes en hsnABC muestran un retraso en la nodulación (44,49,101) lo que apunta hacia hsnD como el principal responsable de la especificidad, lo que además, ha sido comprobado por estudios de hibridación con sondas intragénicas hsnB* y hsnD* (44, 96).

También se ha visto que mutantes obtenidos en esta zona de especi-

ficidad de hospedador pueden dar lugar a un fenotipo con rango de hospedador alterado, así, R.leguminosarum con inserciones por Tn5 en hsn es capaz de nodular en alfalfa y R.trifolii con inserciones por Tn5 en la región III (recordemos que era la equivalente a hsn) es ahora capaz de nodular en guisante (27, 31).

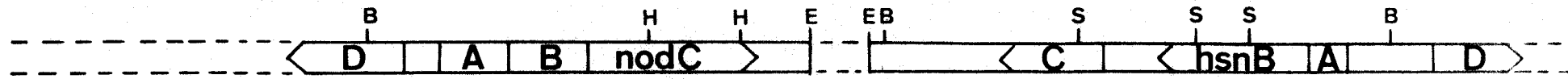
De todas maneras siempre hay que considerar que estas divisiones son meros artificios para una mejor comprensión del hecho simbiótico, ya que el hecho probado de la especificidad de especie que se presenta en la interacción del producto del gen nodD con su inductor, al menos en el caso de la simbiosis trebol rojo- R.trifolii, parece sugerir una revisión en cuanto a considerar a nodD como un gen "común" (114). Además este gen se encuentra ligado a genes hsn tanto en R. meliloti (44) como en Rhizobium sp. NGR234 (4).

Un esquema comparativo de las regiones nod de las cepas R.meliloti, R.leguminosarum y R.trifolii, se muestra en la figura 1.

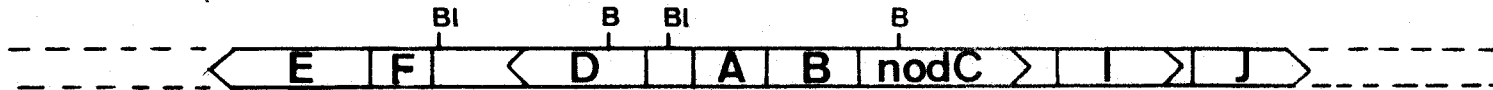
5. REGULACION DE LOS GENES NOD

En cuanto a la regulación de las unidades transcripcionales antes descritas, hay tres factores decisivos implicados directamente:

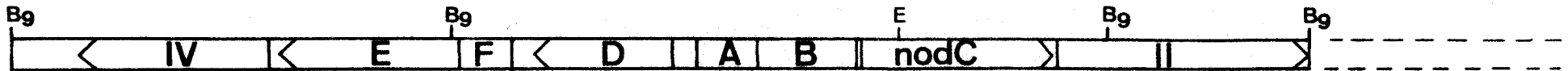
El gen nodD .- Es un gen que se ha visto que regula la expresión del operón nodABC (78) e incluso sufre una autorregulación en el caso de R.leguminosarum(31). También y debido a la estrecha unión entre genes nod y hsn en R.leguminosarum y R.trifolii (98) parece asimismo que regula a estos últimos, pues se ha visto que la expresión de estos es dependiente de un gen nodD funcional,



pRme41b



pRL1J1



pRtrANU843

1Kb

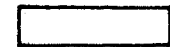


Figura 1. Mapa genético de las regiones nod de los pSym de Rhizobium meliloti 41 (pRme41b), R. leguminosarum 300 (pRL1J1) y de R. trifolii ANU843 (pRtrANU843). B= BamHI; Bl= BclI; Bg= BglII; E= EcoRI; H= HindIII; S= SalI.

así como de los exudados de la planta que actúan como factores desencadenantes (30, 31, 32, 50, 54, 78, 98, 114, 124).

Las 'cajas de nodulación'. - Que son estructuras particulares y diferenciadas dentro del genoma, y constituidas por unas secuencias de 47 pb altamente conservadas, descritas por Rostas y col(101) que se encontraban en número de seis en R.meliloti, cuatro de ellas al frente de las unidades transcripcionales nod y hsl y otras dos en lugares sin aparente relación.(44).

Es posible por tanto pensar en una correulación entre el gen nodD y las cajas de nodulación, lo que parece estar en directa correspondencia con el hecho de que mientras que en R.leguminosarum con una sola copia de nodD hay tres cajas de nodulación, en R.meliloti con dos copias de nodD funcionales existen seis cajas de nodulación.

Exudados de la planta. - Se sabía que el exudado de plantas leguminosas inducía la expresión de muchos operones nod localizados en los plásmidos simbióticos (50, 98), proceso en el que el producto del gen nodD (expresado constitutivamente) se supone que actúa como un regulador positivo (50, 98). Estos compuestos inductores del exudado han sido identificados como flavonas, flavanonas o compuestos relacionados (30, 38, 93, 125), y todos ellos presentes en plantas leguminosas en cantidades apreciables.

Estos compuestos pueden actuar como activadores de la expresión de estos genes (30, 125), como inhibidores, o como reguladores (30,38,93,125). El hecho de que las diferencias entre los compuestos que actúan como inhibidores o

como activadores sea muy pequeña (por ejemplo sustitución de un grupo hidroxilo por un metoxilo) hace suponer un alto grado de especificidad en el reconocimiento, pudiendose pensar en una unión inductor-producto génico similar a la unión fármaco-receptor.

El hecho de que tanto inhibidores como activadores sean secretados por la misma planta hace evidente que los genes nod de Rhizobium están sujetos a un control, mediante su activación o inhibición por diferentes flavonoides específicos de la planta huésped. La especificidad de los compuestos fenólicos excretados por la planta (30,38,93) , que varían de una planta a otra, y su interacción con el producto, por otra parte también específico, del gen nodD (78) serían el principal control sobre el rango de hospedador de un determinado Rhizobium.

Concluyendo, podemos decir que se ha presentado un modelo de regulación de los genes nod por Rossen y col (100), similar a el propuesto para el operón de la arabinosa de Escherichia coli. Rossen especula que el blanco de los compuestos fenólicos tanto estimuladores como inhibidores es el producto de el gen nodD. De tal manera que los productos activadores mediarían la conversión del producto del gen nodD en una conformación que actuaría como regulador positivo, mientras que los compuestos inhibidores, competirían en la ocupación del sitio de unión de los activadores resultando entonces en una nula o pobre activación. Esta conformación activada de nodD debería estimular la transcripción de las cajas de nodulación situadas al frente de los operones nod (101, 111).

6. MUTAGENESIS DIRIGIDA CON Tn5

Los elementos genéticos transponibles, que además confieren resistencia a antibióticos han demostrado ser muy útiles como herramientas de trabajo en ingeniería genética, hasta el punto de que su uso en la actualidad es muy frecuente (Ver 13 y 61 para revisión). Estos 'elementos Tn' o 'transposones' tienen las siguientes propiedades:

A) Su transposición dentro de un gen, normalmente conduce a la inactivación del mismo, dando lugar a una mutación por inserción que generalmente es estable (61).

B) Esta inserción muestra efectos polares en operones multigénicos, inactivándose únicamente aquellos genes que se encuentran, en relación con el sentido de lectura, "a continuación" del sitio de la inserción (77).

Este efecto se piensa que es debido a señales de terminación (codones de terminación) de la transcripción y de la traducción en el transposón.

C) Un mutante por transposición, muestra un nuevo fenotipo (p.e. resistencia a un antibiótico (56) , o un gen lac inactivado (23)) que sirve como marcador selectivo de gran utilidad.

D) El sitio de inserción puede ser analizado fácilmente por análisis de restricción o por hibridación, lo que es de gran utilidad en el caso de mapeo del cromosoma o de plásmidos.

E) La inserción produce "inmunidad" a la transposición de un nuevo elemento transponible. Así, un Tn5 residente, reduce la frecuencia de transposición de un nuevo Tn5 a un décimo de la normal (23).

El transposón usado en este trabajo ha sido el Tn5, elemento transponible de 5400 pb (5) de las que las 1540 pb están repetidas en los dos extremos y forman las secuencias de inserción (IS)(102), mientras que las que forman la zona central (2700 pb) codifican resistencia a antibióticos aminoglicosídicos como kanamicina, neomicina (6) y también estreptomicina en el caso de Rhizobium meliloti (6 , 90).

La mutagénesis con Tn5 ha sido utilizada con éxito en el análisis genético de un gran número de especies bacterianas, tanto de genes cromosómicos (13, 16, 61, 75, 76), como de episomas y plásmidos.

También se ha usado el Tn5 como marcador para la detección de la transferencia de plásmidos, mediante el uso del transposón quimérico Tn5::mob, que ha sido usado ampliamente en diversos vehículos suicidas (9, 57).

Además, se extendió su uso al estudio de los géneros de la familia Rhizobiaceae, pero en este caso, como el fenotipo de una mutación en un gen involucrado en la simbiosis sólo era detectable en plantas, las técnicas convencionales de mutagénesis y detección, eran de uso limitado, so pena de trabajar con un número elevadísimo de plantas para obtener pocos o nulos resultados. De esta manera, la aparición de un vector específico para introducir el Tn5 (9)

hizo posible la preselección de mutaciones al azar, reduciendo el número de plantas a estudiar.

Más tarde Ruvkun y Ausubel (105) y más recientemente G. Ditta (26) extendieron la metodología de la mutagénesis con métodos eficaces y generales de mutagénesis dirigida. En estos casos lo que se asegura es que la mutación sea en una determinada zona del genoma que nos interesa, y no simplemente al azar. Básicamente, este método consiste en clonar la zona de interes en un vector multicopia, mutagenizar el clon con $\text{In}\bar{5}$, y después reintroducirlo en Rhizobium forzando el intercambio entre el genoma silvestre y la zona mutada con el $\text{In}\bar{5}$. De esta manera, se han caracterizado amplias zonas de los pSym involucradas en la simbiosis (10, 27, 29, 55, 70, 121).

Este método de mutagénesis dirigida ha sido el utilizado en este trabajo debido a que ya se encontraba clonada la zona de interés(95) pero en lugar de proceder al intercambio de genes entre la cepa silvestre y el clon mutado, este último se introdujo en derivados curados, que igualmente sirven de blanco de pruebas de complementación.

MATERIALES Y METODOS

=====

1. BACTERIAS Y PLASMIDOS

En la tabla I se muestran los microorganismos y plásmidos (o cósmidos) empleados en este trabajo.

La nomenclatura adoptada para los plásmidos nativos de Rhizobium es la misma que la propuesta por Sciacky y col. (106) para plásmidos de elevado peso molecular de Agrobacterium tumefaciens, y generalizada a Rhizobium por otros autores (19, 88).

2. PLANTAS

Se emplearon Trifolium repens (trébol blanco) ,var Huia; Trifolium pratense (trébol rojo), var. Hamua ; Medicago sativa (alfalfa) variedades Nagiszenas y Aragon (I.N.I.A),y Macroptilium atropurpureum (siratro).

3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Rhizobium meliloti fue crecido en aireación en medio rico YTA (82) o en medio mínimo GTS (60) , a 34 ° C. Las demás especies de Rhizobium se crecieron en medio TY (7) o en medio mínimo MM (20) a 30 °C y en aireación.

Escherichia coli fue crecida a 37°C y con aireación en medio LB

(72).

Cuando fue necesario, se le añadió al medio el antibiótico requerido previamente esterilizado por filtración.

4. ENZIMAS E ISOTOPOS

Las restrictasas BglII, EcoRI, HindIII y XhoI así como la T4 DNA ligasa fueron suministradas por Boehringer Mannheim (R.F.A.) y utilizadas según las recomendaciones de los suministradores y siempre guardando las advertencias de las guías de uso de Roberts (94) y Fuchs y Blakesley (43).

Salvo cuando se diga lo contrario, a la mezcla final de ligación se añadió un 4% de PEG 6000 con objeto de aumentar la eficiencia de ligación (83).

Como marcador radiactivo se utilizó ³²P-dCTP del Kit " Multiprime DNA Oligolabelling System" de Amersham Inc. (Gran Bretaña) ,basado en la técnica descrita por Feinberg y Vogelstein (36) , y siguiendo las indicaciones de el proveedor.

5. ANTIBIOTICOS

Los antibióticos que a continuación se mencionan, así como el quimioterápico ácido nalidíxico, fueron disueltos en agua destilada estéril (salvo la rifampicina que lo fue en metanol) y, justo antes de su uso, esterilizados por filtración al ser añadidos a los medios, a las concentraciones finales aba-

jo indicadas:

Kanamicina	(Km)	25 μ g/ml para E. coli 200 μ g/ml para Rhizobium y Agrobacterium
Rifampicina	(Rif)	50 μ g/ml
Espectinomycin	(Spc)	50 μ g/ml
Tetraciclina	(Tc)	15 μ g/ml
A. Nalidixico	(Nal)	15 μ g/ml

6. TEST DE NODULACION

Las semillas de alfalfa, trébol y siratro fueron esterilizadas superficialmente con cloruro mercurico/etanol, tal y como han descrito otros autores (63, 123).

Una vez estériles y lavadas, las semillas fueron germinadas sobre placas de agar agua (1% de agar Oxoid nº 1 en agua destilada) (63) y finalmente implantadas en solución de Gibson (123) adicionada de agar al 0,8% y contenida en tubos como agar inclinado para las semillas de alfalfa y siratro (63) , o en placas para las semillas de trébol (97) . Se colocó una semilla de alfalfa o siratro por tubo y cuatro semillas de trébol por placa.

Las semillas fueron inoculadas antes de transcurridas 48 horas desde su implantación con aproximadamente 0,1 ml con una suspensión bacteriana conteniendo no más de 10^8 células por mililitro (63, 97).

Las placas se situaron en posición vertical y, como los tubos, se incubaron en cámara de plantas a 22 °C y fotoperiodo de 16 horas de luz a 150 W/m^2 y 8 horas de oscuridad.

La presencia o ausencia de nodulación se analizó a la primera semana y a partir de entonces cada tres días hasta completar un total de 5 para trébol y 6 para siratro.

En todos los casos fueron realizados los ensayos en 20 paralelos y confirmados los resultados por una segunda serie de ensayos.

TABLA I. Bacterias y plásmidos empleados en este trabajo

	características	fuentes o referencias
A. <u>Rhizobium trifolii</u> , silvestre		
RS1051	Spc ^R Rif ^R	(95)
B. <u>R. trifolii</u> , derivados de RS1051		
RS1019, RS1022, RS1023, RS1033, RS1034,	Δ pRtrRS1051a, Nod ⁻	(95)
RS1043	pRtrRS1051a ⁻ , Nod ⁻	(95)
C. <u>R. meliloti</u>		
AK631	Derivado compacto de R. meliloti 41 tipo sil-	A. Kondorosi.

vestre.

ZB 157	AK631 nod 'común'	Z. Bánfalvi.
ZB 138	AK631 nod-nif	Z. Bánfalvi.
L5-30	Tipo silvestre	J. Denarié.
L5-22	L5-30 nod 'común'	J. Denarié.

D. Otras especies de Rhizobium

<u>R. leguminosarum</u> 300	Rif ^R	J. E. Beringer.
<u>Rhizobium</u> sp NGR234	Rif ^R Eur ^R	(118)

E. Agrobacterium tumefaciens

GMI 9017	C58 pAt ⁻ Ti ⁻ Eur ^R Rif ^R	C. Rosenberg
----------	--	--------------

F. Escherichia coli

HB101	<u>hsdS</u> <u>hsdM</u> <u>pro</u> <u>leu</u> <u>thi</u> <u>gal</u> <u>galY</u> <u>recA</u> str ^R	(11)
C2110	<u>polA</u> <u>his</u> <u>rha</u> Nal ^R Rif ^R	G. Ditta

UNF510

HB101::Tr5

(10)

G. Plásmidos y cósmidos

pVK102

cósmido derivado de pRK290

(62)

pGS72

cósmido derivado de pRK290

(110)

pFR14, pFR15

derivados de pVK102 lle-
vando las regiones nod
'común' y hsn de R. tri-
folii RS1051

(95)

pFR1504, pFR1508

derivados delecionados
pFR15 llevando las regiones
nod 'común', hsn y efn de
pFR15

Este trabajo

pFR1506, pFR1509

derivados delecionados de
pFR15 llevando las regiones
nod 'común' y hsn pero no
la región efn

Este trabajo

pFR1501, pFR1502

derivados delecionados Nod-
de pFR15

Este trabajo

pFR1503, pFR1507

pRK2013	plásmido "helper" Km ^R	(37)
pRk2073	plásmido "helper" Spc ^R	G. Ditta
pMEB1	pGS72::fragmento XhoI-XhoI de 15 Kb de pFR15	Este trabajo
K92, k41, K12, R19, 114	Inserciones de <u>In5</u> en la zona de pFR15 que hibrida con <u>nodC</u> *	Este trabajo
R14, 25, 4, K101, F24	Inserciones por <u>In5</u> en la zona de pFR15 que hi- brida con <u>nodD</u> *	Este trabajo
19, 9, R23, k63, F12, K104, 17	Inserciones por <u>In5</u> en la zona de pFR15 que hi- brida con <u>hsnB</u> *	Este trabajo
13	Inserción por <u>In5</u> en la región <u>efn</u> propuesta	Este trabajo

7. REAISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE NODULOS

Los nódulos fueron esterilizados superficialmente con etanol de 96%/Agua Oxigenada 1:1, durante 2 minutos, y a continuación lavados con abundante agua destilada estéril. Finalmente, los nódulos son lisados y trasplantados a medio rico TY (65).

Las colonias resultantes fueron siempre probadas en los medios selectivos oportunos.

8. ANALISIS DE PERFIL DE PLASMIDOS

Se realizó tal y como se indica en F. Rodríguez-Quiñones, Tesis doctoral (95 , 39).

9. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

El ADN purificado, total o digerido, fue corrido en geles horizontales de agarosa sumergidos en tampón TEA (Tris-acetato, 40 mM; AEDT Na , 1mM; pH 8,0) y preparados, por lo general al 1% en el mismo tampón, tal y como se indica en Maniatis y col. (72).

El gel se tiñe durante una hora con Bromuro de Etidio (0,5 μ g/ml

en TBB), se destiñe durante veinte minutos en agua destilada y se visualiza en transiluminador de luz ultravioleta a 254 nm. Se fotografía en película Kodak Tri-X Pan 400 ASA con filtro Kodak Wratten 23 A.

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN fueron calculados según la curva log Pm / movilidad obtenida de acuerdo con las distancias de migración de los fragmentos HindIII del standar lambda c1857 (Biolabs Co. E.E.U. U.): 23,7 ; 9,5 ; 6,7 ; 4,3 ; 2,3 ; 2,0 ; 0,6 y 0,1 Kb.

10. RECUPERACION DEL ADN A PARTIR DE LOS GELES

Los fragmentos de ADN fueron recuperados de los geles por medio de la técnica de electroelución, tal y como está descrita por Maniatis y col. y seguida de purificación con fenol / cloroformo y precipitación con etanol del 96% (72).

11. EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN

A) ADN Total .- ADN genómico total de especies de Rhizobium y Agrobacterium fue obtenido por lisis con SDS/pronasa (Merck) seguida de sucesivas purificaciones con fenol, fenol/cloroformo, cloroformo y finalmente precipitado con etanol y lavado con etanol del 70%, exactamente como se describe en (24).

B) ADN Plasmídico .- El ADN de plásmidos o cósmidos, tanto a gran escala como en minipreparaciones (a partir de 1 litro o 1 mililitro de cultivo), fue aislado por el método de lisis alcalina descrito en el manual de Maniatis y col.(72)

En las preparaciones a gran escala, el ADN es adicionalmente purificado por centrifugación isopícnica a equilibrio en gradiente de Cloruro de Cesio-Bromuro de Etidio, cargándose por cada litro de muestra un gradiente de 34 ml que se ultracentrifuga en rotor vertical Sorvall TV 850 durante 24 horas, a 39000 rpm y 18 °C.

Tras la centrifugación, el Bromuro de Etidio es extraído con alcohol isoamílico y el cloruro de cesio eliminado por diálisis prolongada frente a tampón TEA.

Cuando fue necesario, el ADN se concentró por precipitación con etanol.

C) Plásmidos de Rhizobium .- Los plásmidos recombinantes contenidos en Rhizobium son aislados por una modificación del método de Ish-Horowicz y Burke (52) Las células de 5 ml de un cultivo en fase estacionaria temprana son recogidas y lavadas con 150 μ l de TEN (Tris-clorhídrico, 10 mM; AEDT Na , 1mM; NaCl, 100 mM) conteniendo un 0,1% de Sarkosyl (Sigma). Tras centrifugación, las células son resuspendidas en 160 μ l de solución I (Tris HCl, 25 mM; AEDT Na , 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 5M, pH 4,8), dejando progresar la reacción otros 10 minutos en hielo. Tras centrifugar, el sobrenadante es fenolizado y el ADN finalmente precipitado con etanol y lavado con etanol al 70% (72).

12. OBTENCION DE DERIVADOS DELECCIONADOS DE pFR15

pFR15 fue sometido a digestión limitada separadamente con Eql II y Hind III, estableciendo las condiciones por tratamientos de la misma cantidad de ADN con la misma cantidad de enzima y en tiempos variables como se recomienda en Maniatis y col. (72).

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 los enzimas, con objeto de minimizar la sobrestimación de tamaños moleculares usualmente observada en gel.

La separación de los fragmentos del tamaño deseado se realizó en gradiente continuo de sacarosa (10-40%) exactamente como se explica en el manual de Maniatis y col.(72). Posteriormente se ultracentrifugó en rotor basculante Sorvall AH-267 a 26000 rpm durante 24 horas a 20 °C. Por cada gradiente (5 ml) se cargaron 300 μ g de ADN parcialmente digerido.

Se recogieron fracciones de 100 μ l, que fueron cuidadosamente estudiadas en geles de agarosa de baja concentración (0,6%), corridos a baja tensión durante largo tiempo.

Las fracciones conteniendo ADN, fueron diluidas con agua bidestilada estéril hasta una concentración de sacarosa igual o inferior al 10%, y entonces precipitadas con etanol, lavadas con etanol del 70% y guardadas a 4 °C.

Estas fracciones, una vez tratadas con T4 DNA ligasa, se transformaron en E. coli HB101. Los transformantes obtenidos se seleccionaron por crecimiento en medio rico LB adicionado de tetraciclina.

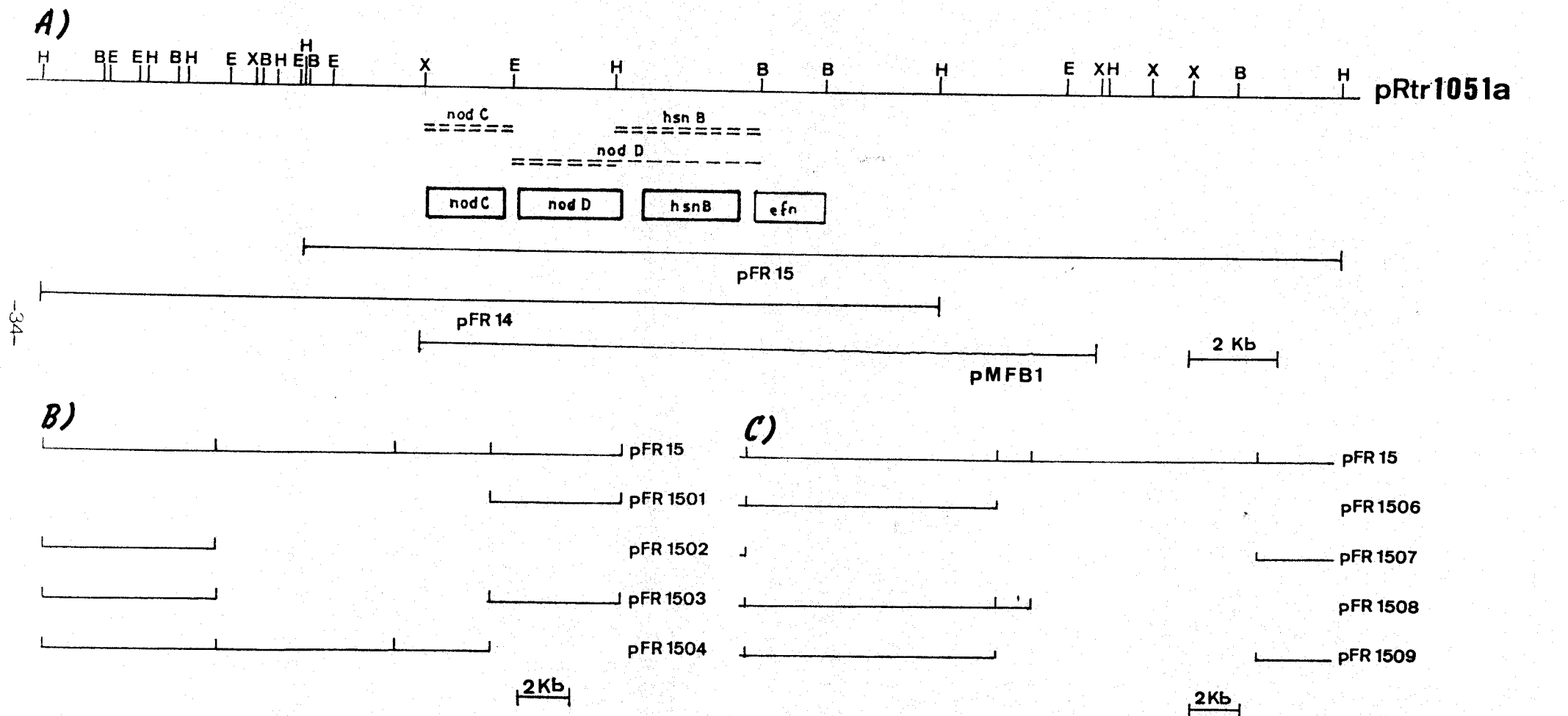
Su contenido en plásmidos se analizó por minipreparación y digestión con las enzimas adecuadas, obteniéndose los derivados indicados en las figuras 2 y 3.

13. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE ADN

A) Conjugación.- La transferencia conjugativa se realizó según lo descrito por Kondorosi y col. (64) . 0,1 ml de cultivo en fase estacionaria temprana del donador fueron mezclados con 0,1 ml de cultivo del receptor de las mismas características, sobre placa de Petri conteniendo medio rico TY. Tras 16 horas de incubación a 30 °C, la masa bacteriana fue recogida en 5 ml de solución salina estéril al 0,9% y sembrada en los medios selectivos apropiados tras conveniente dilución.

En la conjugación triparental, se incorporan otros 0,1 ml de cultivo de E. coli que contiene el plásmido "Helper" pRK2013, o el pRK2073 de acuerdo con lo descrito por Ditta y col (25).

Para obtener los mutantes con In5 la eficiencia de conjugación se aumentó ligeramente realizándola sobre membrana millipore (0,45 µm de diámetro de poro) según la técnica de Jacobs y col. (53).



-34-

Figura 2. A) Mapa físico de la región, del pSym de RS1o51 clonada en pFR14, pFR15 y pMFB1 mostrando los fragmentos en que se detectó homología con sondas *nodC**, *nodD**, y *hsnB** de Rme41, así como la región *efn* propuesta. B) Mapa físico con *HindIII* de pFR15 y derivados conseguidos tras digestión parcial con dicho enzima. C) Mapa físico para *BglII* de pFR15 y derivados obtenidos tras digestión parcial con este enzima. B= *BglII*; H= *HindIII*; E= *EcoRI*; X= *XhoI*.

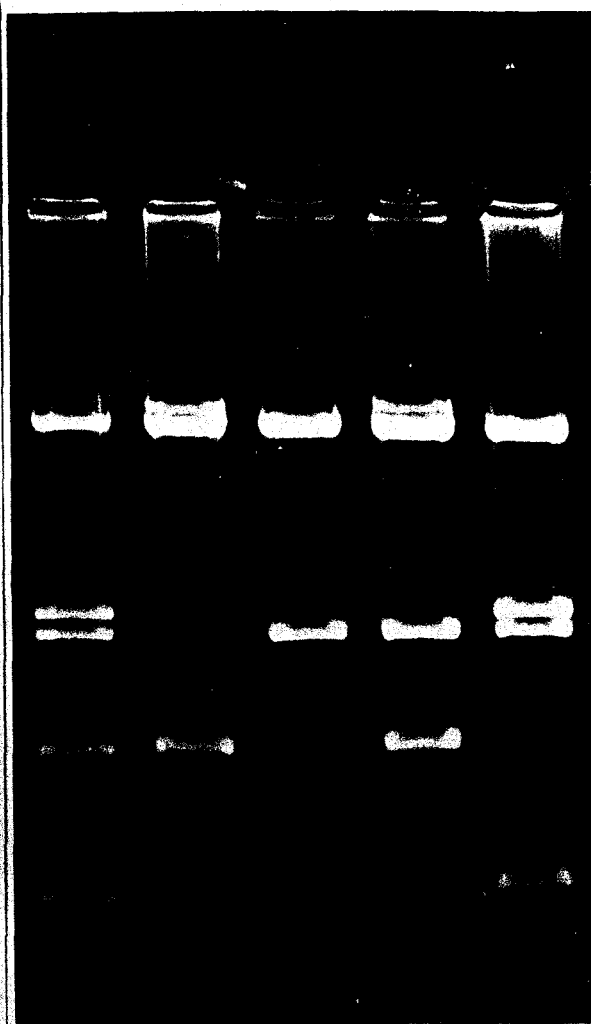
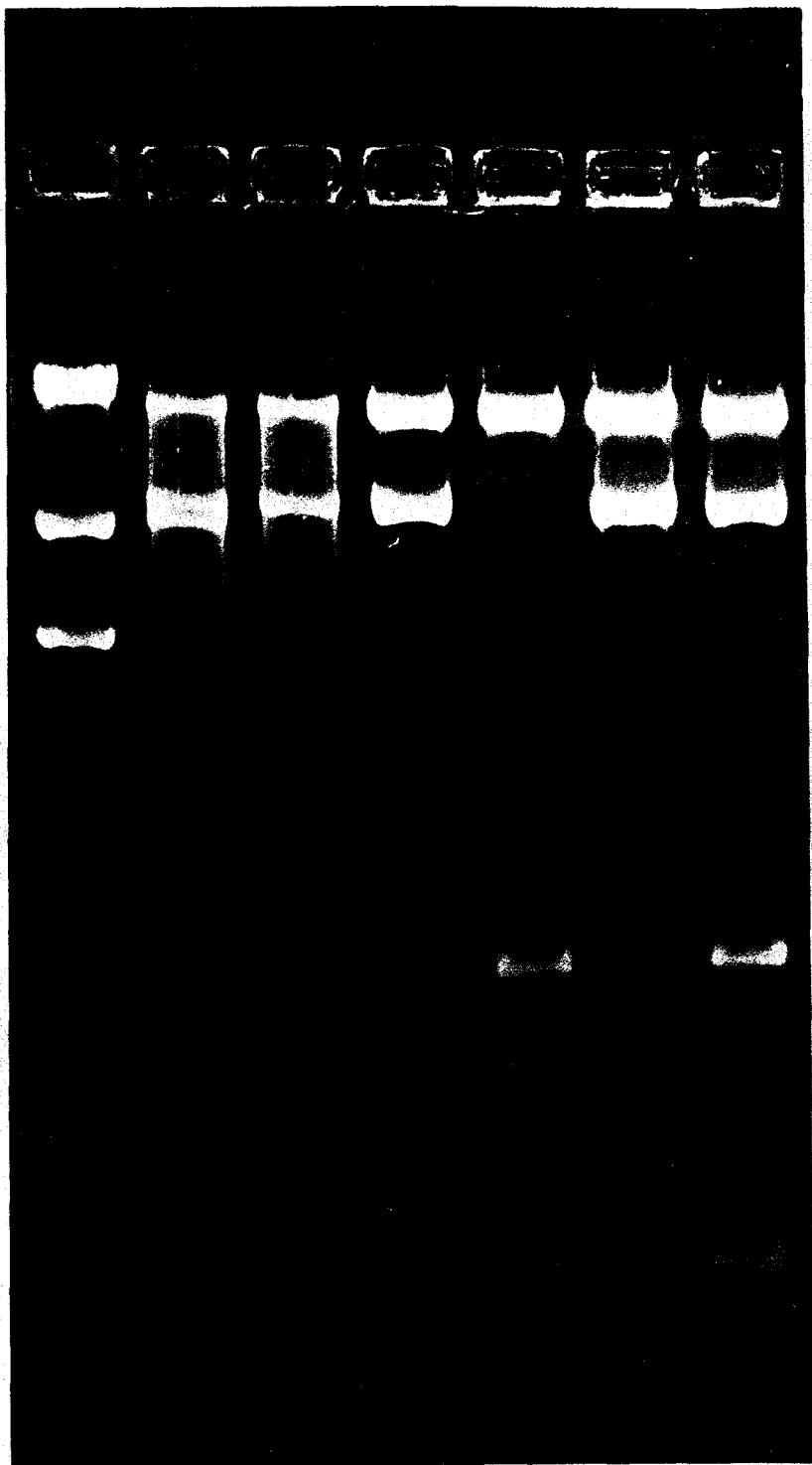
A**B**

Figura 3. A) Digestiones con BglIII de pFR15 (2), pFR1505 (3), pFR1506 (4), pFR1507 (5), pFR1508 (6) y pFR1509 (7); carril 1, λ digerido con HindIII. B) Digestiones con HindIII de pFR15 (1), pFR1501 (2), pFR1502 (3), pFR1503 (4) y pFR1504 (5).

B) Transformación.- Células de E. coli HB101 fueron hechas competentes por tratamiento con cloruro cálcico en frío según la técnica de Cohen y col. (21) . 40 ml de un cultivo de HB101 fueron crecidos hasta una $OD_{600} = 0,6$ a 600 nm. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en el mismo volumen de sulfato magnésico 10 mM; Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, previamente enfriado en hielo. Tras 30 minutos en hielo, las células fueron nuevamente sedimentadas, suspendidas en 40 ml cloruro cálcico 50 mM; Tris-HCl 5 mM, pH 7,4 a 0 °C y guardadas 20 minutos más en hielo. Finalmente, las células competentes se recuperaron por centrifugación suave (4000 rpm) y se resuspendieron en 200 μ l de cloruro cálcico 50 mM; Tris-HCl 5 mM, pH 7,4 preenfriado en hielo. Las células competentes se conservaron a 4 °C hasta su uso que fue siempre el mismo día de su preparación.

Para los 200 μ l de células así tratadas, procedentes de 40 ml de cultivo, se observó en nuestro laboratorio una eficiencia máxima de transformación para 0,4-0,6 μ g de ADN , cayendo bruscamente esa eficiencia cuando se añadía más de 1 μ g de ADN. Así pues, el ADN hasta un máximo de 1 μ g, diluido en 100 μ l de Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, fue añadido a los 200 μ l de células competentes, y siempre se guardó esta proporción de células competentes / ADN.

La mezcla de las células con el ADN se mantuvo en hielo durante 1 hora y después fue expuesta a un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos. Se añadieron después 5 ml de LB estéril y se incubó durante 30-60 minutos a 37 °C para permitir la expresión de los marcadores.

Finalmente, las células se concentraron en 0,5 ml de LB y se

plaquearon en los medios selectivos para los transformantes.

14. HIBRIDACIONES DE ADN

La hibridación del ADN se realizó de acuerdo con lo descrito por Kondorosi y col. (65) .

A) Preparación de los filtros.- Los geles de agarosa fueron desnaturalizados con NaOH y neutralizados con Tris-HCl pH 8,0 exactamente como se describe en el manual de Maniatis y col.(72).El ADN de los geles fue transferido a los filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schüll BA 85, de 45 m de diámetro de poro) por capilaridad de acuerdo con la técnica de Southern (113) , utilizando 20x SSC como solución de transferencia (1 x SSC = NaCl 0.15 M; Citrato Sódico 0,015 M, pH 7,0). Tras la transferencia, los filtros fueron lavados con 2 x SSC, secados y horneados a vacío durante 2 horas a 80 °C.

B) Prehibridación.- Los filtros fueron prehibridados durante 12 horas a 37 °C en bolsas herméticamente cerradas conteniendo 3 x SSC, 50% de formamida desionizada; fosfato disódico 25 mM; fosfato monosódico 25 mM; 0,02% de BSA, de PVP y de Ficoll 400 (Pharmacia), y 500 g/ml de ADN competidor.

C) Hibridación.- La hibridación se llevó a cabo durante 24 horas en idénticas condiciones pero adicionando a la solución anterior la sonda radiactiva (10^8 cpm / μ g de ADN) desnaturalizada por calor (10-15 minutos a 100 °C).

D) Lavado de los filtros.- Tras la hibridación, los filtros se lavaron dos ve-

ces a 42 °C durante una hora, cada una, con 2 x SSC + 0.1% de SDS, y cuatro veces durante una hora con 2 x SSC.

E) Exposición de los filtros.- Una vez secos, los filtros se expusieron a -70 °C durante 1 a 3 días sobre película Kodak X-Omat R con pantalla amplificadora Illford (69).

15. MARCAJE DE ADN

El fragmento BglII-BglII de 1,45 Kb de pER1508 fue electroeluido y marcado con el kit "Multiprime DNA labelling systems" de Amersham Inc (Gran Bretaña) según las indicaciones del proveedor, obteniéndose 10^8 cpm/ μ g de ADN

16. SUBCLONACIÓN

pER15 fue digerido completamente con XhoI y el fragmento XhoI - XhoI de 15 Kb electroeluido, purificado y disuelto en agua bidestilada estéril. Asimismo, pGS72 fue linearizado con XhoI , y ligado al fragmento anterior con T4 DNA ligasa. La mezcla de ligación fue transformada en 100 μ l de HB101 hechas competentes según se describió anteriormente.

Se seleccionaron los transformantes en medio rico con tetraciclina para la presencia del plásmido, y repicando en medio con kanamicina viendo la presencia del inserto por la aparición de colonias sensibles a dicho antibiótico.

Se comprobó que el inserto era el deseado por minipreparación de ADN de las colonias seleccionadas y análisis por restricción del mismo tal como se indicó anteriormente. Así se consiguió el plásmido recombinante pMEB1 cuya relación con los plásmidos pER14 y pER15 (del que se originó) puede apreciarse en la figura 2.

17. MUTAGENESIS DIRIGIDA

pER1508 fue seleccionado como blanco para su mapeo por In5 debido a ser el representante de los derivados delecionados obtenidos con un menor tamaño conteniendo todos los genes necesarios para la nodulación además de la propuesta región efn.

El protocolo de mutagénesis fue exactamente el descrito por G. Ditta (26) . HB101::In 5 (10) fue transformado con ADN plasmídico obtenido de pER1508 . Los transformantes seleccionados en Km y Tc fueron usados como donadores en una conjugación triparental que incluía como receptor a C2110 y como "helper" pRK2073, evitando el uso de pRK2013 por ser este último resistente a Kanamicina. Los transconjugantes así obtenidos fueron sembrados en medio selectivo adecuado. De cada colonia obtenida se hizo preparación de ADN en pequeña escala según se indicó anteriormente y este ADN transformado en HB101. Los transformantes seleccionados por su contenido en plásmidos que habían incorporado el In5 fueron analizados por obtención de su ADN y posterior digestión con las enzimas adecuadas, corridos los fragmentos en geles de agarosa y calculados los tamaños moleculares según lo explicado anteriormente.

RESULTADOS

=====

1. ESTUDIO DEL RANGO DE HOSPEDADOR INDUCIDO POR pFR14 y pFR15

pFR14 y pFR15 fueron introducidos por conjugación triparental, y usando pRK2013 como plásmido 'helper' tal y como se indica en Materiales y Métodos, en los siguientes hospedadores:

- Derivados de Rhizobium trifolii RS1019, RS1022, RS1023, RS1033, RS1034 y RS1043, para ver si restauraba su capacidad de nodular en trébol.
- Rhizobium sp. NGR234, R. lequinosarum 300, R. meliloti AK631, ZB375, ZB138, L5-30, L5-22 y Agrobacterium tumefaciens GMI9017, para ver si era capaz de inducirles la capacidad de nodular en trébol. Además, en el caso de los derivados deletados ZB375, ZB138 y L5-22 para ver si restauraba su capacidad de nodular en alfalfa.

De tal manera que los transconjugantes obtenidos se resuspendieron en solución salina estéril, y fueron usados como inoculantes en las plantas correspondientes, alfalfa para el caso de los derivados de R. meliloti y trébol rojo y blanco para los de R. trifolii, R. lequinosarum, Agrobacterium tumefaciens y Rhizobium sp. NGR234, estudiando la cinética de nodulación tal y como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados en alfalfa fueron todos negativos, pues no hubo complementación en el caso de los derivados deletados, ni tampoco hubo una diferencia significativa en cuanto al número de nódulos o tiempo requerido para la no-

dulación en el caso de L5-30 o AK631 con o sin plásmidos.

En el caso del trébol, no hubo diferencias entre trébol rojo y trébol blanco, produciéndose un 100% de nodulación, alcanzándose el 50% de la misma en 15 días tanto para la cepa silvestre RS1051 como para todos sus derivados complementados con pFR14 o pFR15, excepto en el caso del derivado curado RS1043, que experimentó un retraso de aproximadamente 3 días.

También se produjo un 100% de nodulación en el caso de Rle 300 con pFR14 o pFR15, alcanzándose el 50% de la nodulación con un retraso de 1,5 días.

En el caso de At GMI9017 con pFR14 o pFR15 se formaron pseudonódulos pero con un retraso de unos 12 días.

Ni NGR234 ni ninguno de los R.meliloti probados extendió su rango de hospedador ni con pFR14 ni con pFR15.

En todos los casos se comprobó que la nodulación era "bona fide" por reaislamiento a partir de los nódulos, selección en medio rico TY adicionado de tetraciclina (10 microgramos/ml), y a las bacterias reaisladas se les comprobó:

- Marcadores fenotípicos y características culturales del receptor.

- Presencia de plásmidos de donador o receptor por:

A) Análisis de perfil de plásmidos según se explica en Materiales y Métodos (dato no mostrado).

B) Obtención de ADN plasmídico de Rhizobium, transformación de este a E.coli HB101, y reaislamiento de plásmidos de los transformantes para comprobar por análisis con restrictasas que los plásmidos residentes eran pFR14 ó pFR15.

Además, todos los ensayos se repitieron al menos dos veces, una de ellas en tubo y con 20 paralelos y otra en placa con 25 paralelos, incluyéndose en todos los casos controles positivos (cepa silvestre), así como negativos (no inoculadas o bien el receptor Nod-).

Las cinéticas de nodulación se muestran en la figura 4.

2. NODULACION INDUCIDA POR EL PLASMIDO RECOMBINANTE pMEB1

pMEB1, construido como se indica en Materiales y Métodos, contiene un inserto de 15 Kb del fragmento XhoI-XhoI de pFR15, y que comprende parte de la zona común de pFR14 y pFR15, a excepción de las 2,6 Kb "primeras" de pFR15, como puede observarse en la figura 2.

pMEB1 fue introducido por conjugación triparental y usando como plásmido "helper" pRK2013 en los receptores:

- RS1019 y RS1043 para ver si era capaz de restaurar la capacidad de nodular en trébol.
- Rle 300 y At GMI9017, para ver si era capaz de inducirles a nodular en trébol

Los transconjugantes se usaron como inóculo para trébol, con las mismas condiciones y controles que en el apartado anterior.

Se obtuvo 100% de nodulación y sin retraso con respecto a la cepa silvestre RS1051 en el caso de Rle 300(pMEB1), así como pseudonódulos en el 50% de las plantas inoculadas con At GMI9017 (pMEB1), aunque en este caso con un retraso de 10 días.

En ninguno de los derivados delecionado (RS1019) o curado (RS1043) apareció nodulación sino escasos pseudonódulos con un retraso de 20 días y sólo en un 10% de las plantas.

Estos resultados están representados en la gráfica de cinética de nodulación de la figura 4.

3. EXPERIMENTOS DE RECONSTRUCCION CON LOS DERIVADOS DELECIONADOS DE pER15

Los plásmidos derivados delecionados de pER15, obtenidos tal y como se explica en Materiales y Métodos se usaron como donadores en una conjugación triparental con pRK2013 como plásmido 'helper', realizándose por tanto conjuga-

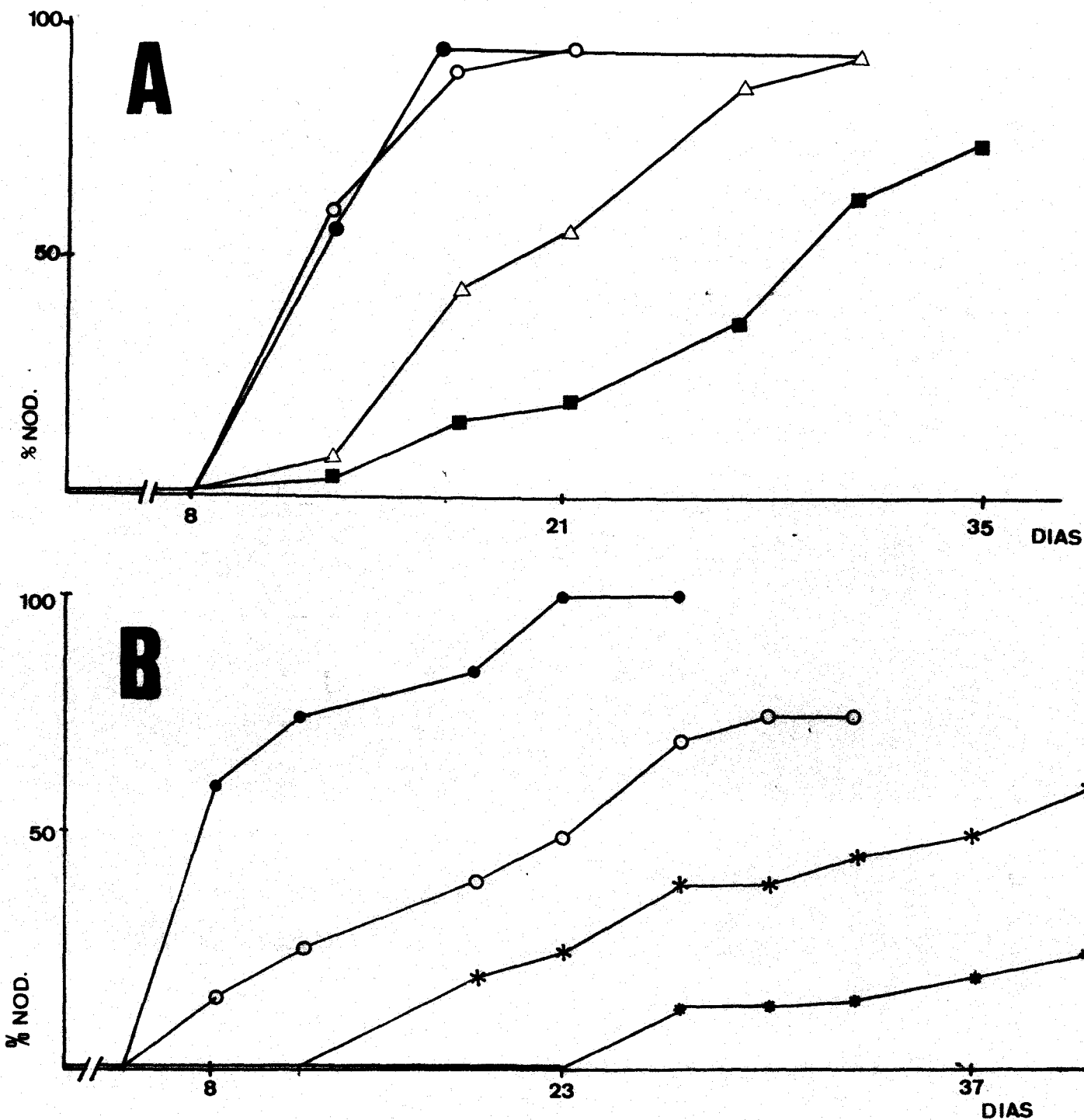


Figura 4. A) Cinética de nodulación en trébol rojo de los derivados indicados conteniendo pFR14 o pFR15, obteniéndose idénticos resultados en trébol blanco: RS1019, RS1022, RS1034 y Rle300 (○); RS1023, RS1033 y RS1043 (△); GMI9017 (■); RS1051 (●) fue usado como control positivo. B) Cinética de nodulación de los derivados indicados conteniendo pMFB1 en trébol rojo: Rle300 (○); GMI9017 (*); RS1019 y RS1043 (*); igual que antes se usó RS1051 (●) como control positivo. % NOD. = Porcentaje de plantas noduladas o con engrosamientos (en el caso de GMI9017).

ciones en las que receptores y donadores fueron los siguientes:

- Donadores: pFR1501, pFR1502, pFR1503, pFR1504, pFR1506, pFR1507, pFR1508 y pFR1509 y pFR15 que actuaba como control positivo.

- Receptores: R. trifolii RS1019, RS1022, RS1023, RS1033, RS1034 y RS1043; así como R. leguminosarum 300 y Agrobacterium tumefaciens GMI9017.

Los transconjugantes obtenidos se usaron para inocular trébol rojo como se indicó en apartados anteriores y realizando también el mismo número de pruebas con idénticos paralelos y controles, obteniéndose que:

A) pFR1504 tuvo igual comportamiento que pFR1508 y que pFR15 (=pFR14), restaurando ambos la capacidad de nodular eficazmente en todos los derivados deletados de RS1051 incluyendo el derivado curado RS1043, aunque en este con un retraso de 3 días. También indujeron la nodulación en Rle 300 y en At GMI9017, pero en este último con un retraso de 10 días. Ambos retrasos, el de RS1043 y el de At GMI9017, eran ya esperados según su comportamiento frente a pFR15 y han de considerarse más bien debidos a la idiosincracia de ambas cepas que a una falta de gen o genes necesarios para la nodulación en el plásmido donador.

B) pFR1506 y pFR1509 se comportaron de igual manera que los anteriores, induciendo a una nodulación efectiva, sólo en el caso de Rle 300.

C) pFR1506 y pFR1509, al ser introducidos en los derivados delecionados y curado de RS1051, así como en At GMI9017, se redujo drásticamente el porcentaje de

nodulación alcanzado, sufriendo de igual manera un retraso en la nodulación y en el número de nódulos por planta a la mitad del conseguido por pFR15 o sus equivalentes y que se puede esquematizar:

- At GMI9017 (pFR1506 o pFR1509), sufrieron un retraso de 25 días respecto al control y sólo se consiguieron pseudonódulos en un 30% de las plantas.
- RS1019, RS1033 ó RS1022 (pFR1506 o pFR1509), tuvieron un retraso de 7 días respecto al control y sólo nodularon el 60% de las plantas.
- Para RS1023, RS1043 ó RS1034 (pFR1506 o pFR1509), el retraso fue de 14 días nodulando sólo el 40% de las plantas.

Las gráficas de cinética de nodulación representativas de cada grupo se muestran en la figura 5.

4. HIBRIDACION CONTRA LA REGION BqII-BqIII DE 1,45 Kb DE pFR1508

Habida cuenta que los resultados anteriores, demostraban fehacientemente el hecho de que esta región influía en la eficiencia de la nodulación, esto hizo pensar en el hecho de que fuera una región común y conservada, y esto nos condujo a realizar la hibridación de dicho fragmento usándolo como sonda radiactiva, preparada como se explica en Materiales y Métodos, frente a ADN total digerido con BqII y HindIII, preparado como se indica en Materiales y Métodos, de distintas especies de Rhizobium relacionados o no, usando como control negativo A. tumefaciens GMI9017. Se obtuvo el resultado que se muestra en la figu-

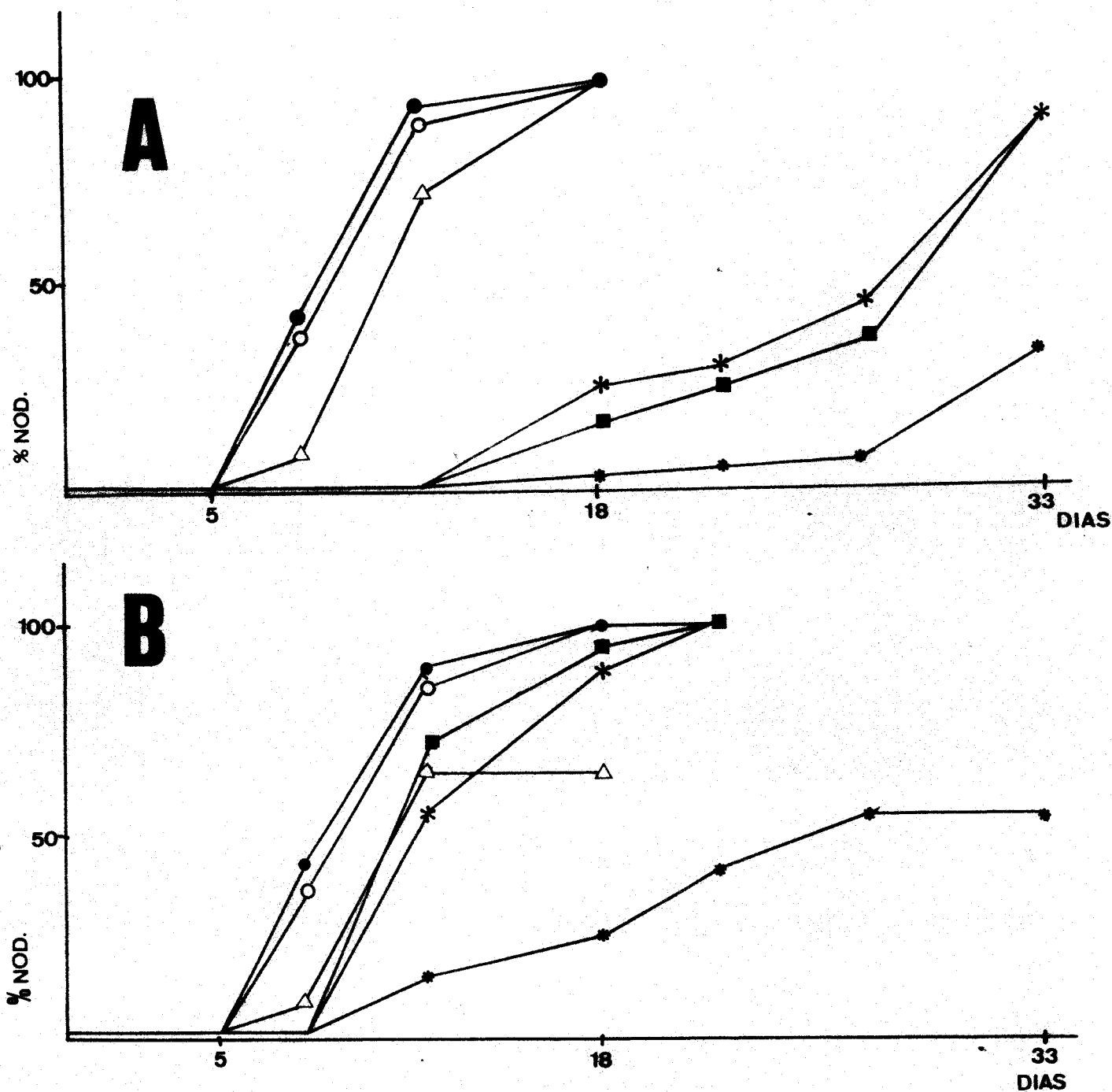


Figura 5. A) Cinética de nodulación en trébol rojo de Rle300 (pFR15) (●) y GMI9017 (pFR15) (*), usados como controles positivos; Rle300 (pFR1504 o pFR1508) (○), (pFR1506 o pFR1509) (△); GMI9017 (pFR1504 o pFR1508) (■), (pFR1506 o pFR1509) (*). B) Idem para RS1019 (pFR15) (●) y RS1043 (pFR15) (■), controles positivos; RS1019 (pFR1504 o pFR1508) (○), (pFR1506 o pFR1509) (△); RS1043 (pFR1504 o pFR1508) (*), (pFR1506 o pFR1509) (*). % NOD. = Porcentaje de plantas noduladas o con engrosamientos (en el caso de GMI9017).

ra 6. Según se puede ver:

- No aparece ningún tipo de homología con At GMI9017 que nos servía como control negativo.
- En RS1051 se encontraron al menos dos copias de la región de 1,45 Kb, de las que una todavía persiste en los derivados delecionados RS1019, RS1022, RS1033 mientras que los derivados RS1023 y RS1034 con deleciones mayores, lo mismo que el derivado curado RS1043 carecen por completo de la región estudiada.
- Como era de esperar según los resultados obtenidos en planta, también en R. leguminosarum 300 se observa homología con la región de 1,45 Kb.
- Se detecta sin embargo sólo débil homología en el caso de Rhizobium sp. NGR234 y en R. meliloti AK631, en el que también aparecen dos copias, una de las cuales está ausente en sus derivados ZB138 y ZB375.

5. FENOTIPO SIMBIOTICO DE LOS MUTANTES pER1508::Tn5

Los mutantes obtenidos por inserción de Tn5 en pER1508 como se explica en Materiales y Métodos fueron mapeados, y localizado su sitio de inserción en pER1508, cuya disposición se muestra en la figura 7.

Una vez conocida su posición exacta interesaba saber el fenotipo simbiótico de dichas mutaciones, por lo que dichos mutantes fueron usados como donadores en una conjugación triparental usando pRK2073 en este caso como plás-

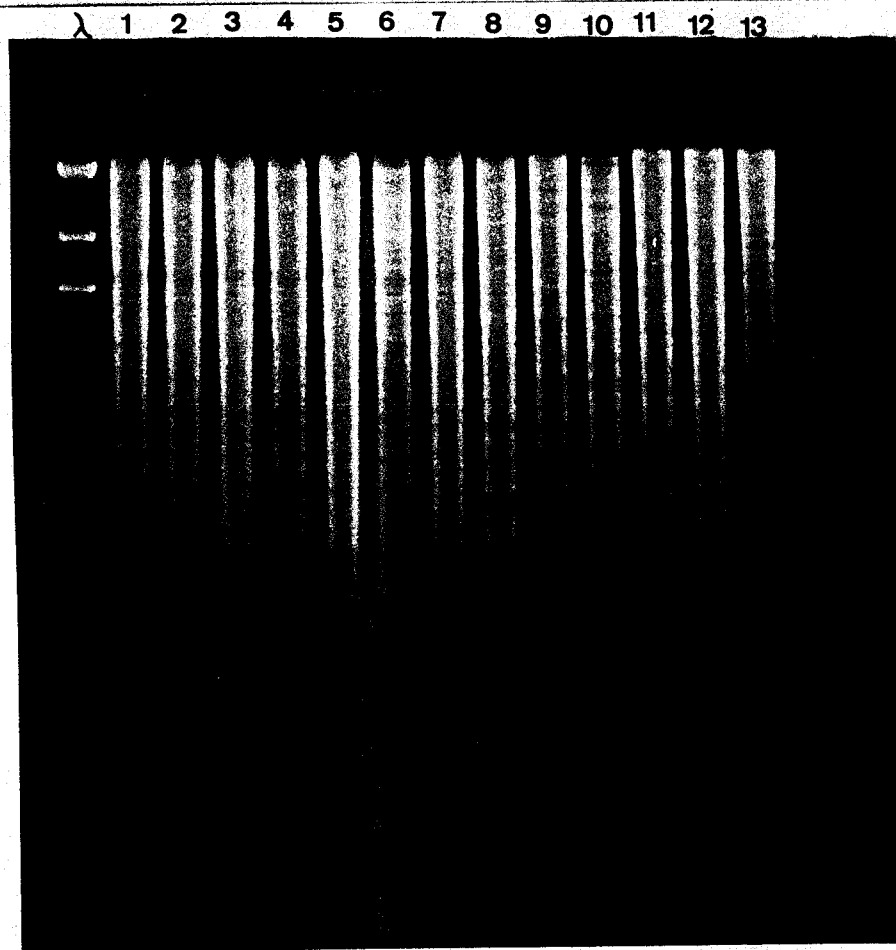
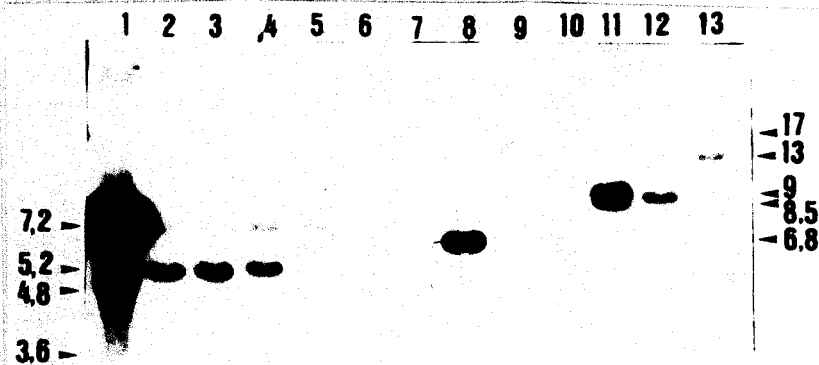
A**B**

Figura 6. A) ADN total digerido con HindIII de RS1051 (1), RS1019 (2), RS1022 (3), RS1033 (4), RS1034 (5), RS1023 (6), RS1043 (7) Rle 300 (8), NGR234 (9), GMI9017 (10), AK631 (11), ZB375 (12) y ZB138 (13). B) Autorradiograma frente a efn^* . El tiempo de exposición fue de 24 horas. Las distancias marcadas son tamaños en Kb.

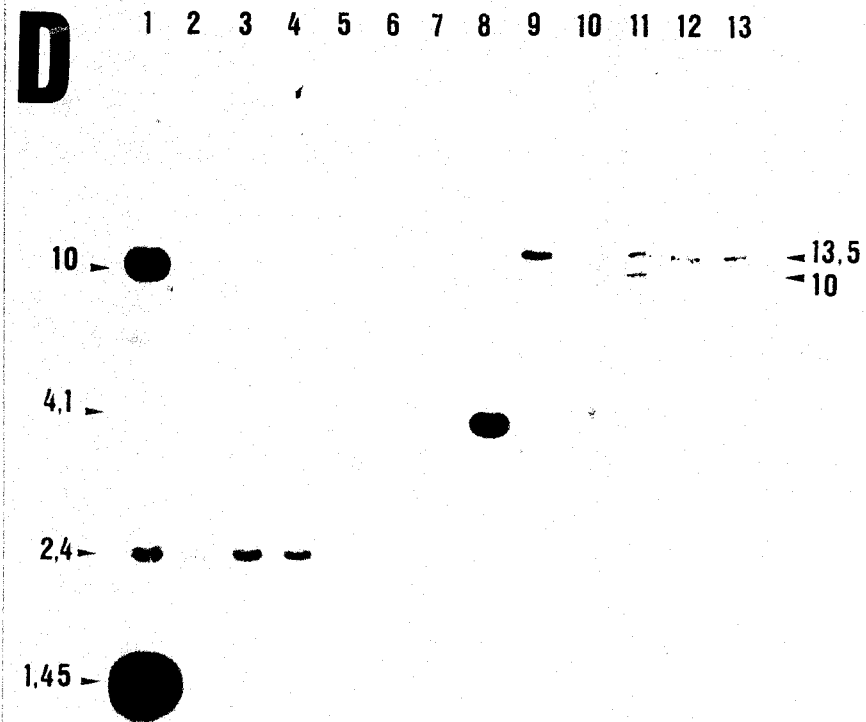
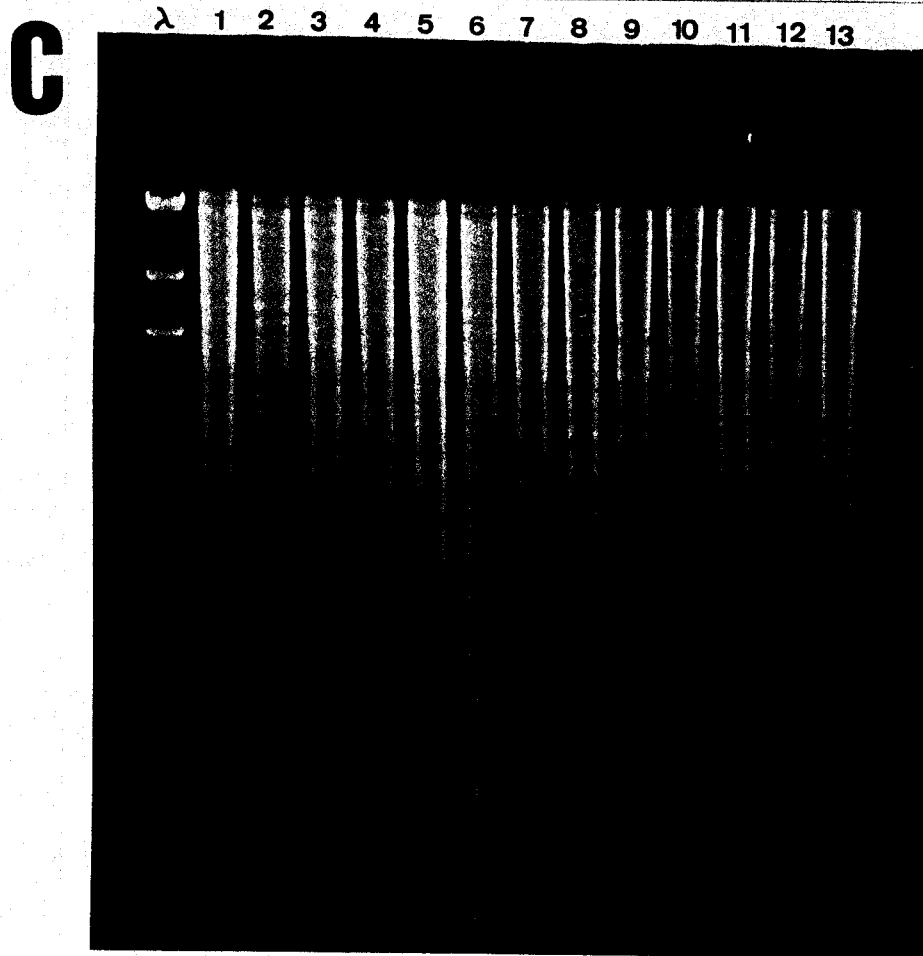


Figura 6. C) ADN total digerido con BglII de RS1051 (1), RS1019 (2), RS1022 (3), RS1033 (4), RS1034 (5), RS1023 (6), RS1043 (7) Rle 300 (8), NGR234 (9), GMI9017 (10), AK631 (11), ZB375 (12), ZB138 (13). D) Autorradiograma frente a efn* El tiempo de exposición fue de 24 horas. Las distancias marcadas son tamaños en Kb.

mido "helper", y como receptores fueron usados tanto los derivados RS1043 (curado) y RS1019 (deletado) de R. trifolii, como R. leguminosarum 300, sirviendo de controles los mismos receptores a los que se les introdujo pFR1508.

Los resultados son también mostrados en la figura 7, concluyéndose que se obtuvieron fundamentalmente tres fenotipos: Nodulación, no nodulación o retraso en la nodulación. Esto está relacionado con la zona mutada de acuerdo con lo siguiente:

- Región nod "común", que corresponde a los fragmentos XhoI-EcoRI y EcoRI-Hind III de pFR1508, que hibridaban respectivamente frente a nodC* y nodD*. Cuatro de las inserciones condujeron a un fenotipo Nod- cuando se trato de complementar con ellas a los derivados deletado (RS1019) y curado (RS1043) y de las siete inserciones que se obtuvieron en esta zona, la inserción 25 mostró un retraso en la nodulación, a la vez que también un menor número de nódulos por planta, mientras que con las R19 y F24 sólo hubo una disminución en el número de nódulos.

En el caso en que el receptor fue R1e 300, cinco de estas inserciones no variaron de manera alguna ni el número de nódulos por planta, ni hubo retraso en la nodulación respecto a los controles con pFR1508. En dos de las inserciones de esta zona hubo un comportamiento distinto, pues en el caso de K101 hubo una disminución de hasta la mitad en el número de nódulos por planta mientras que en caso de F24 se produjo un retraso en la nodulación de unos 20 días y se obtuvieron tres veces menos nódulos que en los controles.

Rle 300

RS 1019

RS1043

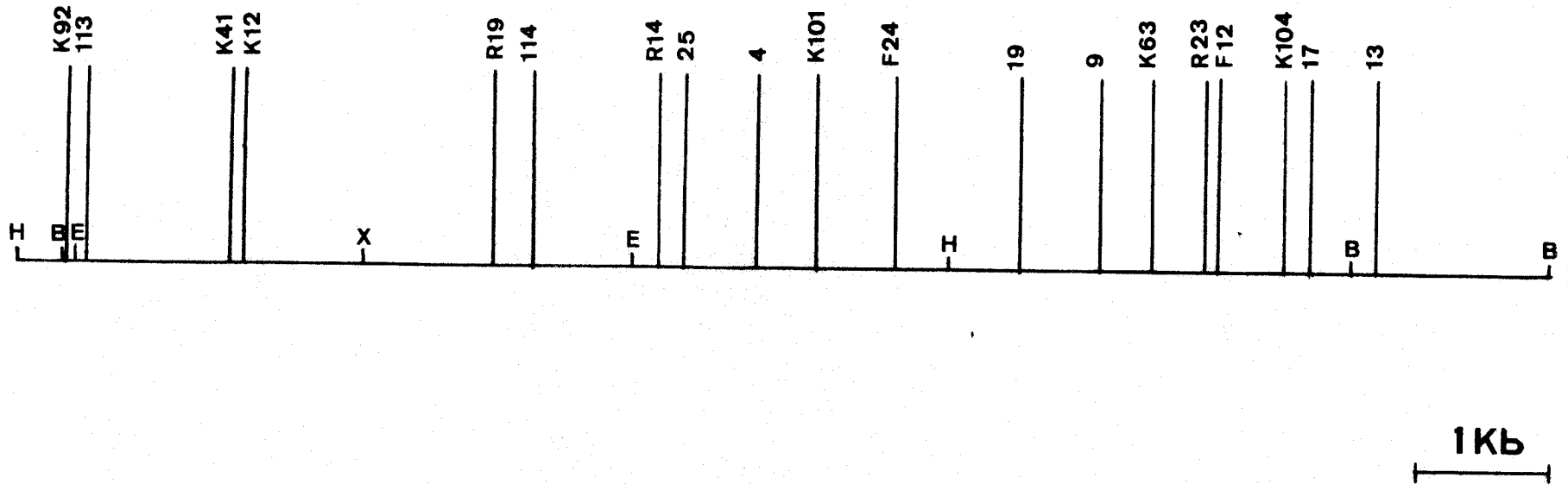


Figura 7. Mapa físico de las inserciones por Tn₅ obtenidas en pFR1508, y fenotipo de las mismas al ser introducidas en los receptores indicados. (●) Nod+; (○) Nod-; (●) retraso en la nodulación; B sobre el símbolo indica que el número de nódulos por planta fue la mitad que en los controles con pFR1508. B= BglII; H= HindIII; E= EcoRI; X= XhoI.

- Región 'hsn': las inserciones en la región HindIII- BglII de pFR1508 que hibridaba con hsnB,* que se usaron para complementar RS1019 y RS1043 condujeron a un fenotipo Nod- en el caso de 9, R23 y F12, un retraso en la nodulación y la mitad de nódulos por planta en el caso de K63 mientras que con K104 y 19 se mostraba un claro fenotipo Nod+. La inserción 17 mostró un fenotipo de nodulación con un retraso de 1,5 días respecto al control con pFR1508, y el número de nódulos por planta se redujo a la mitad, dando por tanto resultados similares a los de el control con pFR1506 por lo que esta inserción se considera similar a la 13 como se explicará más adelante.

Cuando el receptor fue R1e 300, se produjo un claro retraso en la nodulación de hasta 10 días para el caso de 9, K63, R23 y F12, a la vez que el número de nódulos por planta se reducía a la mitad. K104 y 19 mostraron un fenotipo Nod+, pero en la 19 el número de nódulos se redujo a la mitad.

- Región 'efn': Se corresponde con la zona de 1,45 Kb que diferencia a pFR1508 de pFR1506. En esta zona sólo se obtuvo la inserción 13, que condujo como se esperaba según los test de nodulación efectuados anteriormente a un fenotipo Nod+ pero con un retraso de 1,5 y 10 días con respecto al control y con la mitad de nódulos por planta que este cuando los receptores fueron RS1019 y RS1043, pero en el caso de R1e 300 no se produjo variación en absoluto ni en el tiempo necesario para la nodulación ni en el número de nódulos por planta, lo que está en plena concordancia con los experimentos de reconstrucción con pFR1508 y pFR1506.

- Región XhoI- HindIII de 2,4 Kb 'primeras' de pFR1508 y 'anteriores' a la zona nod 'común'. En las pocas inserciones que se obtuvieron en esta zona, sólo se

observó un fenotipo Nod+, aunque por la disposición y número de estas no se pueden sacar conclusiones definitivas, los posibles supuestos que se deducen como consecuencia de este y otros experimentos se detallan en los capítulos de Discusión y Conclusiones. En honor a la claridad y para adecuar nuestros resultados a los de otros autores también vamos a considerar esta zona como región nod "comun" (ver Discusión).

Las cinéticas de nodulación obtenidas se exponen en la figura 8.

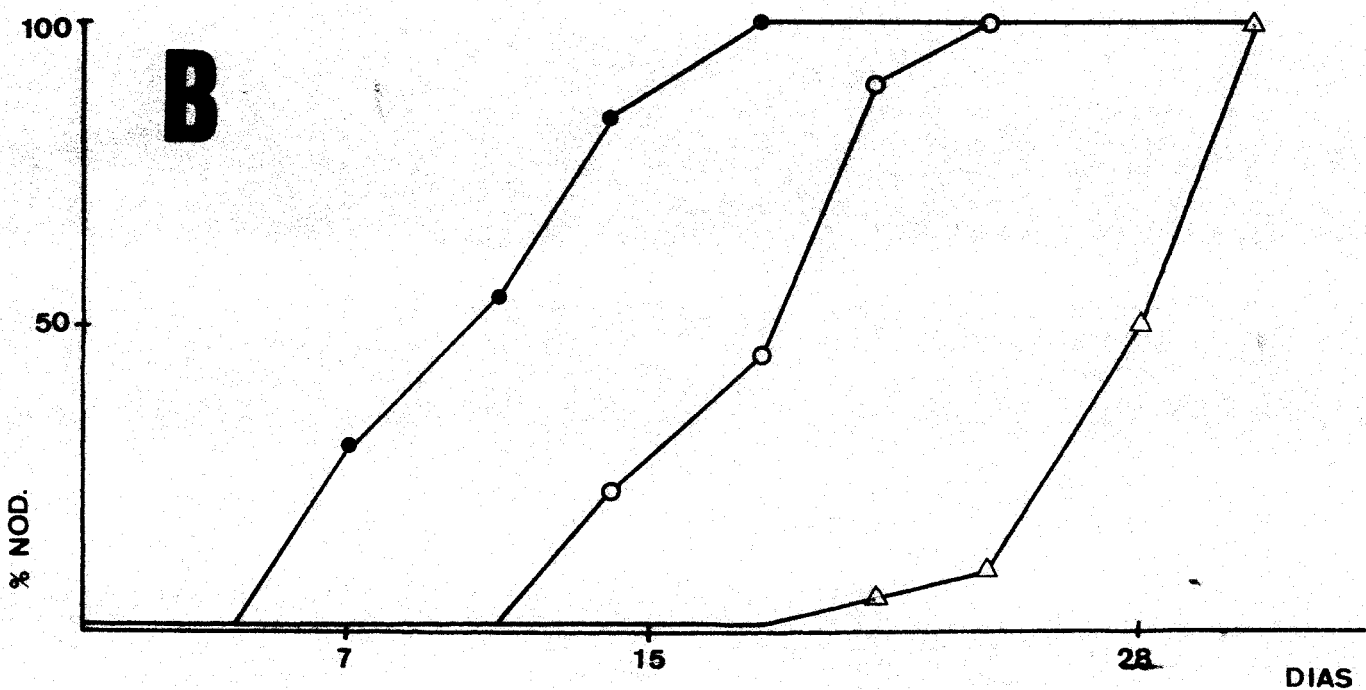
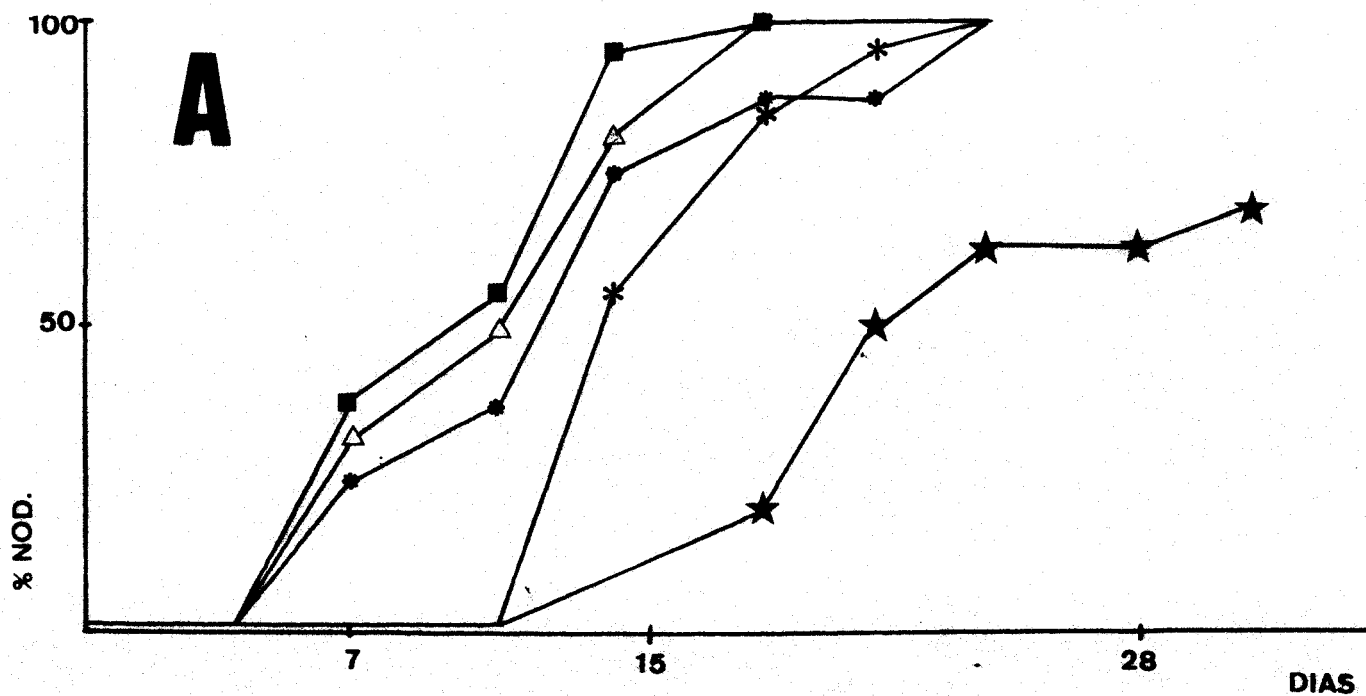


Figura 8. A) Cinética de nodulación de los controles RS1051 (■), RS1019 (pFR1508) (△), RS1019 (pFR1506) (*), RS1043 (pFR1508) (*), RS1043 (pFR1506) (★). B) Cinética de nodulación de Rle300 (pFR1508::Tn5): Inserciones K101, 4, 19, K12, K104, 13, R14, 17, 25, R19, K41, 113, 114, K92 (●); inserciones 9, F12, R23, K63 (○); inserción F24 (△). % NOD. = Porcentaje de plantas noduladas (trébol rojo).

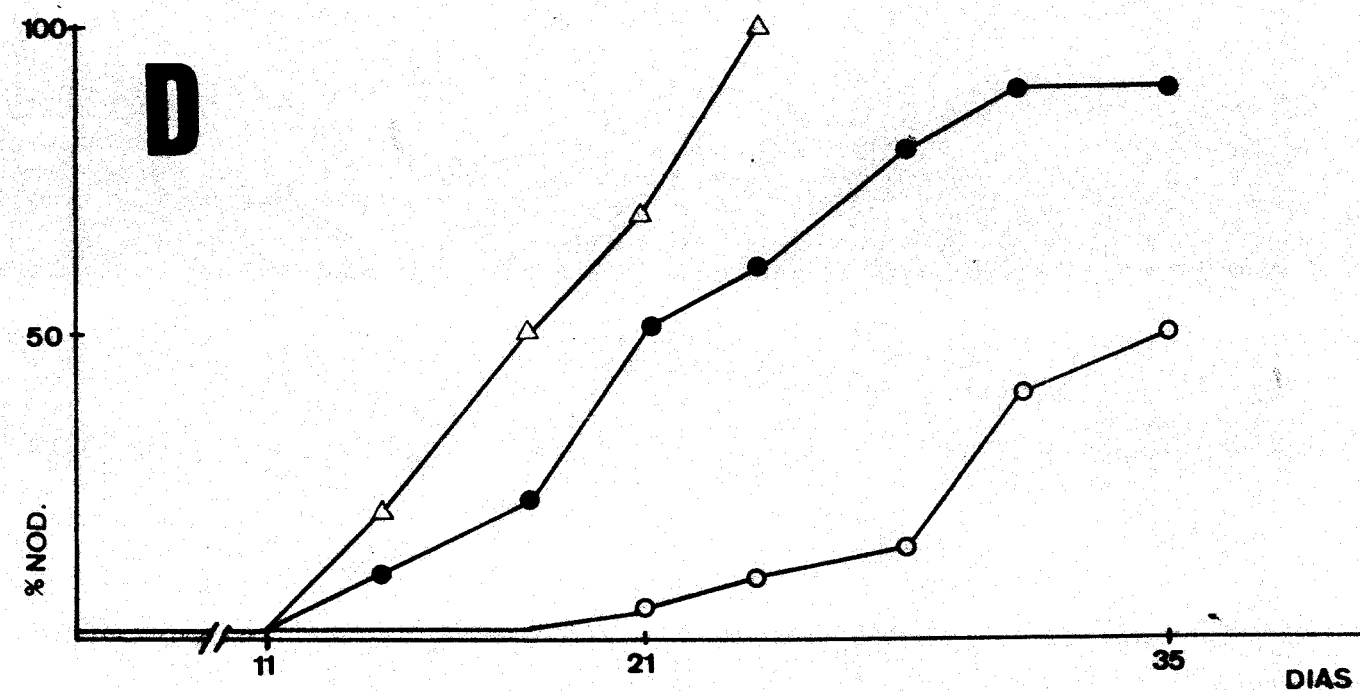
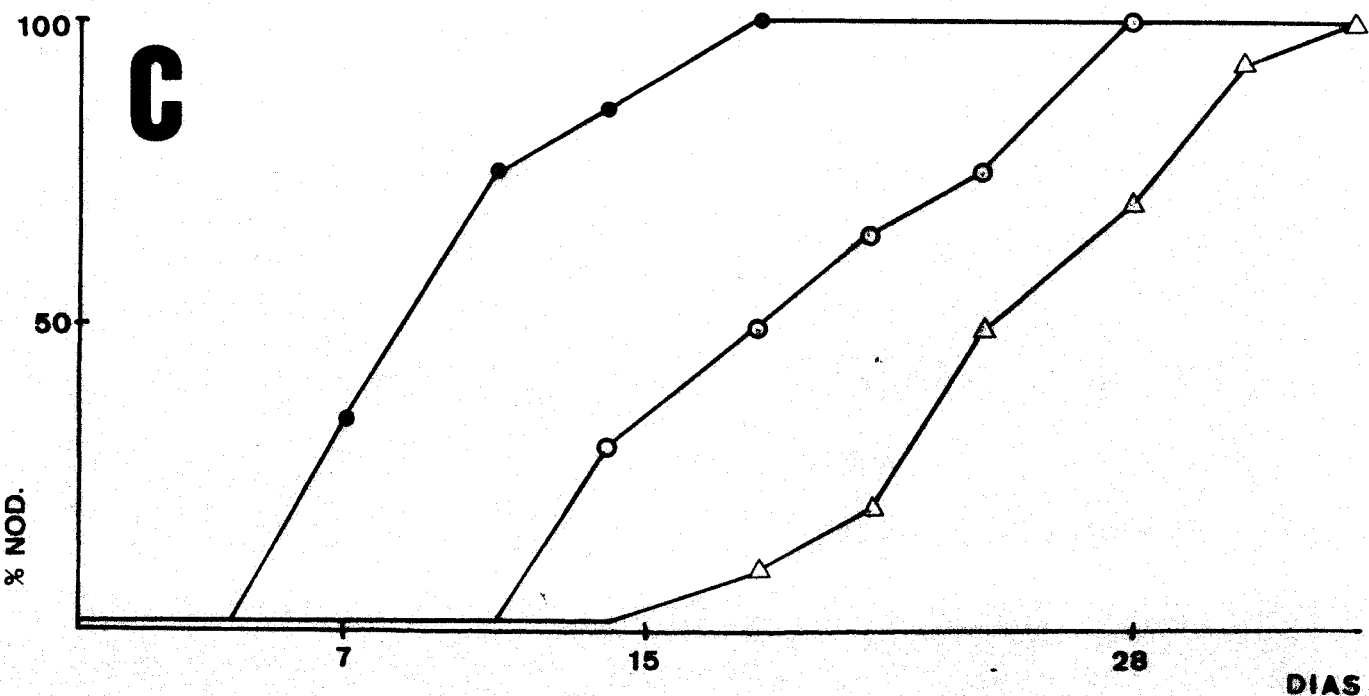


Figura 8. C) Cinética de nodulación de RS1019 (pFR1508::Tn₅): Inserciones 19, K41, 113, k92, F24, K12, K104, R19 (●); inserciones 13 y 17 (○); inserciones K63 y 25 (△). D) Idem para RS1043 (pFR1508::Tn₅): Inserciones 19, K41, 113, K92, F24, K12, K104, R19 (△); inserciones 13 y 17 (●); inserciones K63 y 25 (○). % NOD. = Porcentaje de plantas noduladas (trébol rojo).

D I S C U S I O N

=====

De los experimentos de complementación realizados con los genes nod de Rhizobium trifolii RS1051 clonados en pFR14 y pFR15(95), observamos que a diferencia de los homólogos de R. trifolii ANU843, clonados en pRt032, ni pFR14 ni pFR15 son capaces de inducir nodulación en trébol de Rhizobium sp. NGR234 (108), pero sin embargo, si eran capaces de inducir la formación de engrosamientos o pseudonódulos en trébol cuando se introducían en Agrobacterium tumefaciens GM19017, lo que está en concordancia con resultados anteriores (65), si bien en este caso, con un retraso de unos 20 días.

Esto nos hace pensar que debe haber alguna diferencia entre los genes nod o hsn de R. trifolii RS1051 y ANU843, que haga a la primera tener un rango de hospedador más estrecho o bien que los productos de genes hsn de NGR234 intervengan inhibiendo la expresión de los genes hsn de RS1051 y no de ANU843, algo similar a lo que ya ha sido sugerido para R. meliloti (51).

También falló el intento de ampliar el rango de hospedador de R. meliloti AK631 y L5-30 a trébol usando pFR14 y pFR15, lo cual es coincidente con resultados publicados anteriormente (41, 51) y que hacen mención a una posible especificidad del gen hsnD en la relación simbiótica R. meliloti-alfalfa y la posibilidad de que este gen además de intervenir en la especificidad intervenga también en la nodulación "per se", mientras que los genes hsn de R. trifolii intervendrían únicamente en la especificidad.

Es también curioso el hecho de que usando como sonda hsnD^{*}, esta sólo hibridase frente a ADN total de distintos R. meliloti y de las especies de amplio rango de hospedador como Rhizobium sp. NGR234 y Bradyrhizobium japonicum mientras que no se apreció señal alguna en el caso de R. trifolii ni R. leguminosarum (96). De este modo es posible relacionar la presencia del gen hsnD con la incapacidad de los genes de otras especies para ampliar el rango de hospedador de estas especies, o lo que es lo mismo que estas especies con un gen particular de su relación simbiótica como sería en este caso el hsnD, serían más difícilmente dirigidas por productos génicos extraños a ellas para establecer una nueva relación simbiótica.

Igualmente, el gen nodD posee una importancia tremenda por su papel regulador de los demás genes nod, además de que al menos en el caso de la relación R. trifolii-trébol blanco se le ha reconocido un papel en la especificidad de hospedador (114) y teniendo en cuenta que R. meliloti tiene dos copias funcionales frente a una sola en R. trifolii, también es posible que este caso la dominancia de los genes de R. meliloti sobre los de R. trifolii sea debido a un fenómeno de dosis génica.

Otra diferencia marcada entre RS1051 y ANU843 en que mientras en esta última, la región más pequeña descrita que contiene los genes necesarios para la nodulación en trébol es de 14Kb, lo cual se correspondía con la región común a pFR14 y pFR15, y la región subclonada en pFR1504, en este trabajo se describe un clon (pFR1508) que contiene todos los genes necesarios para la nodulación en una región no mayor de 10 Kb además de un fragmento de 1,45 Kb que influye en la eficiencia de la nodulación (que diferencia al anterior del

clon pER1506). Tanto pER1508 como pER1506, restauran la nodulación de los derivados deletados y curado de RS1051, si bien en este último la falta de esta región de 1,45 Kb retrasa drásticamente la nodulación y reduce en la mitad el número de nódulos por planta. Por tanto y por similitud con una zona antes descrita por Putnoky y col(91) , hemos decidido llamar a esta zona efn.

De otra parte se intentó acortar aún más la región nod, intentando experimentos de complementación con el plásmido recombinante pMEB1, pero los resultados fueron negativos tanto para los derivados deletados como para el curado de RS1051, lo que demuestra que uno o más genes comunes deben encontrarse en la zona de 2,5 Kb HindIII-XhoI de la "izquierda" de pER1508. Por lo tanto pMEB1 podía inducir a nodular trébol a R. leguminosarum 300 porque este posee todos sus genes "comunes". Asimismo era capaz de inducir la formación de pseudonódulos cuando el receptor era A. tumefaciens, pero como es normal en esta bacteria, con un retraso de 15 días.

Si bien no hubo nodulación en el caso de los derivados curado y deletados de RS1051 con pMEB1, si se observó la aparición de pseudonódulos en el 10% de las plantas y con un retraso que oscilaba entre los 20 y los 30 días para los derivados deletado y curado respectivamente. Estos engrosamientos pueden ser debidos quizá al efecto de productos de los genes hcn, que permitirían una interacción planta-microbio específica, pero al faltar la acción de uno o más genes comunes degeneraría en este tipo particular de interacción sin completar la formación de un nódulo normal, lo cual no es difícil que así ocurra puesto que los genes nod "comunes" se encuentran directamente relacionados con las etapas iniciales del proceso de infección como son la curvatura del pe-

lo radical, la formación del cordón de infección, etc. (108, 28).

Si estas suposiciones son ciertas, esto explicaría también el fenómeno que ocurre con A. tumefaciens en el que tanto el conjunto de los genes nod clonados en pFR14, pFR15, pFR1504 o pFR1508 como los hsl clonados en pMEB1 conducen a la formación de pseudonódulos sin diferencia entre el tiempo requerido ni el número de nódulos por planta.

Es así por tanto que A. tumefaciens no necesita de los genes nod "comunes" para establecer su particular relación con las leguminosas, lo que implicaría que el camino de entrada de este microorganismo a los meristemos de la planta no pasa por la vía de la curvatura del pelo radical con la formación del cordón de infección, fenómenos ambos controlados por los genes nod "comunes". Y si esto es así, también en el caso de los pseudonódulos formados tanto por RS1019 (pMEB1) como por RS1043(pMEB1), es más que probable que dicha invasión de los tejidos de la planta se deba a un mecanismo similar al que se desarrolla en A. tumefaciens.

El proceso de mutagénesis con In5 de pFR1508, sirvió para dibujar con más precisión el mapa físico genético de la región nod de R. trifolii, ya acortada al máximo en 11,45 Kb según los resultados de los experimentos anteriores. La mutagénesis de este clon nos habría de servir para descubrir la extensión de los genes de una forma más precisa que con los datos de hibridación que ya poseíamos, así como para averiguar la funcionalidad de dichos genes.

En la región "común", se observó que las inserciones sobre nodII

conducían a un fenotipo Nod- con lo que descubrimos que la segunda copia de nodD no es funcional, o bien es una copia incompleta al igual que ocurre en otras especies de Rhizobium (44, 96). De las inserciones obtenidas en la zona que hibridaba con nodD* obtuvimos que mientras que las centrales conducían a un claro fenotipo Nod- , a ambos lados aparecían inserciones que conducían a un retraso en la nodulación, lo que es indicador de inserciones marginales y que sirven para delimitar aproximadamente las longitudes de los genes, en nuestro caso el gen nodD se puede encontrar sobre una región de un máximo de 1,5 Kb, entre dos inserciones, una de las cuales es Nod+ y la otra presenta retraso en la nodulación (ver figura 7).

En la zona correspondiente al operon nodABC (que hibridó frente a nodC* (95, 96)), se obtuvieron sólo dos inserciones, una de ellas con una disminución en el número de nódulos, puede ser una línea divisoria entre dos genes mientras que la otra con fenotipo Nod- es claramente una inserción intragénica, por lo que en base a esto podemos hacer dos supuestos:

A) Que el operon nodABC, esté desde la última posición detectada para nodD, es decir desde la inserción 25 hasta la inserción R19, o bien que hasta esta inserción constituya la fracción nodAB y nodC corra desde R19 hasta un punto que estaría como máximo en K12, lo que explicaría una falta de genes 'comunes' en el clon pMEB1, en este caso los genes comparables a los nodIJ descritos para R. leguminosarum, y que tendrían una homología funcional con la región II de R. trifolii ANU843, cuya función parece ser reguladora de nodABC e influir en la formación del cordón de infección.

B) que el operón completo nodABC este comprendido entre las inserciones 25 y R19, y de ahí en adelante estuviese el operón nodIJ, y que parece ser se transcribe a continuación de nodABC.

En el caso en que R. leguminosarum 300 fue el receptor ninguno de los mutantes en esta zona nod "común" influyó de manera apreciable retrasando la nodulación o variando el número de nódulos por planta.

Del estudio de la región hsn se dedujo que esta se extendía a lo sumo entre las inserciones 19 y K104 que ya mostraban un fenotipo Nod+, mientras que las inserciones internas 9, R23 y F12, mostraban fenotipos Nod-, y la k63 mostraba un retraso en la nodulación, típico de las inserciones marginales. De ello se puede concluir que en la región hsn hay al menos dos genes, que se encuentran probablemente agrupados en una unidad transcripcional hsnAB (nodFE) igual a las descritas anteriormente (27, 49, 68, 108).

Además el hecho de que al utilizar como receptor R. leguminosarum estas inserciones produjeran un retraso grande en la nodulación, confirma el hecho comprobado por hibridación de que en esta zona se encuentren los genes de especificidad de hospedador (hsn), a la vez que apunta un dato más en favor de la diferente designación de estos genes respecto a los nod "comunes". De todas maneras este operón puede estar en dos orientaciones posibles, una en que se lea en la misma dirección que nodI, o en la contraria, lo que no se puede deducir con los datos que poseemos y sería necesario para ello un estudio más detallado por secuenciación.

La inserción 17 aunque se encuentra en la zona que hibridó con hsnB^{*}, mostró un comportamiento idéntico a la inserción 13 de la región BqII--BqIII de 1,45 Kb que se propuso como efn. Pues bien ambas inserciones, 13 y 17 se comportan en los derivados deletado RS1019 y curado RS1043, así como en R. leguminosarum de igual manera que lo hace pER1506, por lo que podemos concluir que la región propuesta como efn se extiende ahora en una región que abarca 2Kb aproximadamente (hasta la inserción K104, considerada como límite por dar fenotipo Nod+ en todos los receptores).

Usando el fragmento BqII-BqIII de 1,45 Kb como sonda radiactiva se observó su conservación en distintas especies de Rhizobium incluso poco relacionadas como Rhizobium sp. NGR234, por lo que esta zona se puede considerar como "común", pues además se ha demostrado al menos en un caso que esta homología es funcional, pues vease que no hay diferencia entre la nodulación en trébol de R. leguminosarum 300 con pER1506 ó pER1508.

Esta región se encuentra repetida al menos dos veces en RS1051 pero o bien las otras copias no son funcionales, puesto que las inserciones por Tn5 en la región efn de pER1508 conducen indefectiblemente a un comportamiento idéntico al de pER1506, o bien puede deberse a un problema de dosis génica, y que se necesite el producto de todas las copias de este gen para una nodulación eficaz en clara concordancia con lo descrito para el gen nodD en R. meliloti (44). Pero de todas formas esto sólo sería cierto para R. trifolii RS1051, ya que R. leguminosarum con su única copia nodula igual de eficientemente trébol con pER1508 ó pER1506.

CONCLUSIONES

=====

1. Los plásmidos deletados pER1504 (con un inserto de 14 Kb) y pER1508 (con un inserto de 11,45 Kb) son capaces de restaurar eficientemente la nodulación de los derivados deletados y curado de R. trifolii RS1051. Otros plásmidos deletados pER1506 y pER1509 (con un inserto de 10 Kb) también restauraban la capacidad de nodular a los derivados deletados, pero con un retraso de 1,5 días y la mitad de nódulos por planta.
2. Se ha propuesto una región efn, que influye en la eficiencia de la nodulación, que por datos de hibridación ha mostrado encontrarse en al menos dos copias en R. trifolii RS1051, de las cuales parece ser que sólo es funcional la clonada en pER1508, si bien también es factible la teoría de la dosis génica. Esta región se ha demostrado que se extiende sobre una zona de 2 Kb, según los datos obtenidos por mutagénesis con Tn5.
3. Usando como sonda de hibridación la región efn de 1,45 Kb Bq111-Bq111, frente a ADN total de varias especies de Rhizobium relacionados o no, se ha visto que esta región es 'común' a todas las especies probadas en las que se encuentra al menos en una copia.
4. Se ha mapeado pER1508 con 19 inserciones por Tn5, con lo que se ha logrado conocer de manera más detallada la región nod de RS1051, destacando:

A) Se ha encontrado asociada a los genes hsp una región efn que se extiende a

continuación de estos en una región no mayor de 2 Kb.

B) La región hsg esta constituida al menos por dos genes y restringida a una zona de 2 Kb como máximo.

C) nodD se extiende como máximo en una región de 1,5 Kb.

D) De la región correspondiente a nodABCIJ sólo se puede asegurar que se extiende más allá del punto XhoI de pFR1508, y que hay una separación intergénica determinada por la inserción R19. Datos más precisos por intensa mutagénesis de esta zona son necesarios para establecer nuevos postulados.

5. De las dos copias del gen nodD que presentaba el genoma de RS1051, sólo es funcional la clonada en pFR15, ya que las inserciones por Tn5 en este gen conducen a un fenotipo Nod-.
6. No sólo pFR15 o pFR14, sino también sus derivados deletados pFR1504, pFR1506 y pFR1508, así como el plásmido recombinante pMEB1 son capaces de ampliar el rango de hospedador de R. leguminosarum 300 a trébol. Asimismo, todos ellos inducen a la formación de pseudonódulos por parte de Agrobacterium tumefaciens en trébol.

BIBLIOGRAFIA

=====

1. ALAZARD, D. 1985. Stem and root nodulation in Aeschynomene spp. Appl. Environ. Microbiol., 50: 732-734.
2. BACHEM, C. W. B., KONDOROSI, E., BANFALVI, Z., HORVATH, B., KONDOROSI, A., SCHELL, J. 1985. Identification and cloning of nodulation genes from the wide host range Rhizobium strain MPIK3030. Mol. Gen. Genet., 199: 271-278.
3. BANFALVI, Z., SAKANYAN, V., KONCZ, C., KISS, A., DUSHA, I., 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.
4. BASSAM, B. J., ROLFE, B. G., DJORDJEVIC, M. A. 1986. Macroptilium atropurpureum (siratro) host specificity genes are linked to a nodD-like gene in the broad host range Rhizobium strain NGR234. Mol. Gen. Genet., 203: 49-57.
5. BERG, D. E., DAVIS, J., ALLET, B., ROCHAIX, J. D. 1975. Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72:3628-3632
6. BERG, D. E., JORGENSEN, R., DAVIES, J. 1978. Transposable Kanamycin-neomycin resistance determinants. En: Microbiology-78, pp.13-15, American Society for Microbiology, Washington DC. Schlessinger D. (ed.).
7. BERINGER, J. E. 1974. R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 84: 188-198.

8. BERINGER, J. E., JOHNSTON, A. W. B., WELLS, B. 1977. The isolation of conditional ineffective mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 98: 339-343.
9. BERINGER, J. E., BEYNON, J. L., BUCHANAN-WOLLASTON, A. V., JOHNSTON, A. W. B. 1978. Transfer of the drug-resistance transposon In5 to Rhizobium. Nature, 276: 633-634.
10. BORTHAKUR, C. E., BARBER, C. E., LAMB, J. W., DANIELS, M. J., DOWNIE, J. A., JOHNSTON, A. W. 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum but not of beans by R. phaseoli and is corrected by cloned DNA from Rhizobium or the phytopathogen Xanthomonas. Mol. Gen. Genet., 203: 320-323.
11. BOYER, H. S., ROULLAND-DUSSOIX, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. J. Mol. Biol., 41: 459-472.
12. BROWN, S. E., AUSUBEL, F. M. 1984. Mutations affecting regulation of the Klebsiella pneumoniae nifH promoter. J. Bacteriol., 157: 143-147.
13. BRUJIN, F. J., LUPSKI, J. R. 1984. The use of transposon In5 in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids- a review. Gene, 27: 131-149.
14. BUCHANAN-WOLLASTON, V., CANNON, M. C., BEYNON, J. L., CANNON, E. C. 1981.

Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in Klebsiella pneumoniae. *Nature*, 294: 776.

15. BUENDIA-CLAVERIA, A. M., RUIZ-SAINZ, J. E. 1985. Isolation of mutants of fast-growing soybeans strains that are effective on comercial soybean cultivars *Physiol. Plant.*, 64: 507-512.

16. BUIKEMA, W. J., LONG, S. R., BROWN, S. E., VAN DEN BOS, R. C., EARL, C., AUBEL, F. M. 1983. Physical and genetic characterization of Rhizobium meliloti symbiotic mutants. *J. Mol. Appl. Gen.*, 2: 249-260.

17. BURNS, R. C., HARDY, R. W. F. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer Verlag. New York.

18. CANGELOSI, G. A., HUNG, L., PUVANESARAJAH, V., STACEY, G., OZGA, D. A., LEIGH, J. A., NESTER, E. 1987. Common loci for Agrobacterium tumefaciens and Rhizobium meliloti exopolysaccharide syntesis and their roles in plant interactions. *J. Bacteriol.*, 169: 2086-2091.

19. CASSE, F., BOUCHER, C., JULLIOT, J. S., MICHEL, M., DENARIE, J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229-242.

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

21. COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., HSU, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110-2114.
22. CORBIN, D., DITTA, G., HELINSKI, D. R. 1982. Clustering of nitrogen fixation (nif) genes in Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 149: 221-228.
23. DE VOS, G. F., WALKER, G. C., SIGNER, E. R. 1986. Genetic manipulations in Rhizobium meliloti utilizing two new transposon Tn5 derivatives. Mol. Gen. Genet., 204: 485-491.
24. DHAESE, D., DE GREDE, H., DECRAEMER, H., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M. 1979. Rapid mapping of transposon insertions and deletion mutation in the large Ti-plasmid of Agrobacterium tumefaciens. Nucleic Acids Res., 7: 1837-1849.
25. DITTA, G., STANFIELD, S., CORBIN, D., HELINSKI, D. R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gen bank of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 7347-7351.
26. DITTA, G. 1986. Tn5 mapping of Rhizobium nitrogen fixation genes. Methods Enzymol., 118: 519-528.
27. DJORDJEVIC, M. A., SCHOFIELD, P. R., ROLFE, B. G. 1985. Tn5 mutagenesis of Rhizobium trifolij host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. Mol. Gen. Genet., 200: 463-471.

28. DJORDJEVIC, M. A., SCHOFIELD, P. R., RIDGE, R. W., MORRISON, N. A., BASSAM, B. J., PLAZINSKI, J.M.; WATSON, J.M.; ROLFE, B.G. 1985. Rhizobium nodulation genes involved in root hair curling (Hac) are functionally conserved. Plant Mol. Biol., 4: 147-160.
29. DJORDJEVIC, M. A., HANCAI CHEN, BATLEY, M., REDMOND, J. W., ROLFE, B. G. 1987. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of Rhizobium sp. strain NGR234 and R.trifolii is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. J. Bacteriol., 169: 53-60.
30. DJORDJEVIC, M. A., REDMOND, J. W., BATLEY, M., ROLFE, B. G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii. EMBO. J., 6: 1173-1179.
31. DOWNIE, J. A., ROSSEN, L., KNIGHT, C. D., SHEARMAN, C., EVANS, I. J., JOHNSTON, A. W. B. 1985. The structure and regulation of the nodulation genes of Rhizobium leguminosarum. En: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Nitrogen Fixation Research Progress. pp. 95-100. H. J. Evans, P. J. Bottomley & W. E. Newton (eds.). Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht/Boston/Lancaster.
32. DOWNIE, A. J., JOHNSTON, A. W. B. 1986. Nodulation of legumes by Rhizobium: The recognized root?. Cell, 47: 153-154.
33. DREYFUS, B. L., DOMMERGUES, Y. R. 1981. Stem nodules on the tropical legume Sesbania rostrata. En: Current Perspectives in Nitrogen Fixation. p.471. A. H.

Gibson & W. E. Newton (eds.). Australian Academy of Science. Canberra.

34. DUSHA, I., KOVALENKO, S., BANEALVI, Z., KONDOROSI, A. 1986. Rhizobium meliloti insertion element ISRm2 and its use for identification of the fixX gene. J. Bacteriol., 169: 1403-1409.

35. DYLAN, T., IELPI, L., STANFIELD, S., KASHYAP, L., DOUGLAS, C., YANOFESKY, M. NESTER, E., HELINSKI, D. R., DITTA, G. 1986. Rhizobium meliloti genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in Agrobacterium tumefaciens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 4403-4407.

36. FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochem., 132: 6-13.

37. FIGURSKI, D. H., 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.

38. FIRMIN, J. L., WILSON, K. E., ROSSEN, L., JOHNSTON, A. W. B. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in Rhizobium is reversed by other compounds present in plants. Nature, 324: 90-92.

39. FISHER, H-M., ALVAREZ-MORALES, A., HENNECKE, H. 1986. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: Bradyrhizobium japonicum nifA gene is involved in control of nif gene expression and formation of determinate symbiosis.

EMBO J., 5: 1165-1173.

40. FISHER, H-M., HENNECKE, H. 1987. Direct response of Bradyrhizobium japonicum nifA-mediated nif gene regulation to cellular oxygen status. Mol. Gen. Genet., 209: 621-626.
41. FISHER, R. F., TU, J. K., LONG, S. R. 1985. Conserved nodulation genes in Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii. Appl. Environ. Microbiol., 49: 1432-1435.
42. FORRAI, T., VINCZE, E., BANFALVI, Z., KISS, G. B., RANDHAWA, G. S., KONDOROSI, A. 1983. Location of symbiotic mutations in Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 153: 635-643.
43. FUCHS, R., BLAKESLEY, R. 1983. Guide to the use of type II restriction endonucleases. Methods Enzymol., 100: 3-38.
44. GOTTFERT, M., HORVATH, B., KONDOROSI, E., PUTNOKY, P., RODRIGUEZ-QUINONES, F., KONDOROSI, A. 1986. At least two nodD genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti. J. Mol. Biol., 191: 411-420.
45. GOVERS, F., MOERMAN, J. M., DOWNIE, A., HOOYKAAS, P., FRANSSEN, H. J., LOUWERSE, J., VAN KAMMEN, A., BISSELING, T. 1986. Rhizobium nod genes are involved in inducing an early nodulin gene. Nature, 323: 564-566.
46. HALVERSON, L. J., STACEY, G. 1986. Signal exchange in plant-microbe inter-

actions. Microbiol. Rev., 86: 193-225.

47. HOMBRECHER, G., BREWING, N. J., JOHNSTON, A. W. B. 1981. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in Rhizobium leguminosarum and R. phaseoli. Mol. Gen. Genet., 182: 133-136.

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

49. HORVATH, B., KONDOROSI, E., JOHN, M., SCHMIDT, J., TOROK, I., GYORGYPAL, Z. BARABAS, I., WIENEKE, U., SCHELL, J., KONDOROSI, A. 1986. Organization, structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa. Cell, 46: 335-343.

50. INNES, R. W., KUEMPEL, P. L., PLAZINSKI, J.; CANTER-CREMERS, H., ROLFE, B. G., DJORDJEVIC, M. A. 1985. Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in Rhizobium trifolii. Mol.Gen.Genet., 201: 426-432.

51. INNES, R., DJORDJEVIC, M. A., ROLFE, B. G., DENARIE, J., ROSENBERG, C., KUEMPEL, P. 1987. Interactions between Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii nodulation genes: what is the basis for dominance by R. meliloti?. En: Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster. D.P.S. Verma & N. Brisson (eds.).

52. ISH-HOROWICZ, D., BURKE, J. F. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.*, 9: 2989-2998.
53. JACOBS, A. E., CRESSWELL, J. M., HEDGES, R. W. 1976. Properties of plasmids constructed by the in vitro insertion of DNA from Rhizobium leguminosarum or Proteus mirabilis into RP4. *Mol. Gen. Genet.*, 147: 315-323.
54. JACOBS, T. W., EGELHOFF, T. T., LONG, S. R. 1985. Physical and genetic map of a Rhizobium meliloti nodulation gen region and nucleotide sequence of nodC. *J. Bacteriol.*, 162: 469-476.
55. JAGADISH, M. N., SZALAY, A. A. 1984. Directed transposon In5 mutagenesis and complementation in slow-growing, broad host range cowpea Rhizobium. *Mol. Gen. Genet.*, 196: 290-300.
56. JORGENSEN, R. A., ROTHSTEIN, S. J., REZNIKOFF, W. S. 1979. A restriction enzyme cleavage map of In5 and location of a region encoding neomycin resistance. *Mol. Gen. Genet.*, 177: 65-72.
57. JOHNSTON, A. W. B., BEYNON, J. L., BUCHANAN-WOLLASTON, A. V., SETCHELL, S. M., HIRSCH, P. R., BERINGER, J. E. 1978. High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of Rhizobium. *Nature*, 276: 634-636.
58. KALUZA, K., FUHRMANN, M., HAHN, M., REGENSBERGER, B., HENNECKE, H. J. 1983. In Rhizobium japonicum the nitrogenase genes nifH and nifDK are separated. *J. Bacteriol.*, 155: 915-918.

59. KEYSER, H. H., BOHLOOL, B. B., HU, T. S., WEBER, D. F. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*, 215: 1631-1632.
60. KISS, G. B., VINCZE, E., KALMAN, Z., FORRAI, T., KONDOROSI, A. 1979. Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in Rhizobium meliloti. *J. Gen. Microbiol.*, 113: 105-118.
61. KLECNER, N., ROTH, J., BOTSTEIN, D. 1977. Genetic engineering in vivo using translocatable drug-resistance elements. *New methods in bacterial genetics* *J. Mol. Biol.*, 116: 125-159.
62. KNAUF, V. C., NESTER, E. W. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an Agrobacterium Ti plasmid. *Plasmid*, 8: 45-54.
63. KONDOROSI, A., SVAB, Z., KISS, G. B., DIXON, R. A. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. *Mol. Gen. Genet.*, 151: 221-226.
64. KONDOROSI, A., VINCZE, E., JOHNSTON, A. W. B., BERINGER, J. E. 1980. Comparison of three Rhizobium linkage maps. *Mol. Gen. Genet.*, 178: 403-408.
65. KONDOROSI, A., KONDOROSI, E., PANKHURST, C. E., BROUGHTON, W. J., BANEALVI, Z. 1982. Mobilization of a Rhizobium meliloti megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and Agrobacterium. *Mol. Gen. Genet.*, 188: 433-439.

66. KONDOROSI, A., KONDOROSI, E., BANEALVI, Z., BROUGHTON, W. J., PANKHURST, C. E., RANDHAWA, G. S., WONG, C. H., SCHELL, J. 1983. Analysis of symbiotic nitrogen fixation genes carried by the Rhizobium meliloti megaplasmid. En: Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction. pp. 55-63. A. Pühler (ed.). Springer Verlag. Berlin/Heidelberg.
67. KONDOROSI, A., KONDOROSI, E., HORVATH, B., GOTTFERT, M., BAHAM, C., RODRIGUEZ-QUINONES, F., BANEALVI, Z., PUTNOKY, P., GYORGYPAL, Z.; JOHN, M., SCHMIDT, J., SCHELL, J. 1986. Common and host specific nodulation genes and their conservation in other rhizobia. En: Molecular Genetics of Plant-Microbe interactions. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster. D.P.S. Verma y N.Brisson (eds.).
68. LAMB, J. W., DOWNIE, J. A., 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.
69. LASKEY, R. A., MILLS, A. D. 1977. Enhanced autoradiographic detection of ³²P and ¹²⁵I using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Lett., 82: 314-316.
70. LEIGH, J., SIGNER, E. R., WALKER, G. C. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6231-6235.
71. MAIER, R. J., BRILL, W. J. 1976. Ineffective and non-nodulation mutant stra-

ins of Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 127: 763-769.

72. MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

73. MARTINEZ, E., PARDO, M. A., PALACIOS, R., 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.

74. MEADE, H. M., LONG, S. R., RUVKUN, G. B., BROWN, S. E., AUSUBEL, F. M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by transposon In5 mutagenesis. J. Bacteriol., 149: 114-122.

75. MEGIAS, M. 1981. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

76. MEGIAS, M., CAVIEDES, M. A., PALOMARES, A. J., PEREZ-SILVA, J. 1982. Use of plasmid R68.45 for constructing a circular linkage map of the Rhizobium trifolii chromosome. J. Bacteriol., 149: 59-64.

77. MERRICK, M., FILSER, M., KENNEDY, C., DIXON, R. 1978. Polarity of mutations induced by insertion of transposons In5, In7 and In10 into the nif gene cluster of Klebsiella pneumoniae. Mol. Gen. Genet., 165: 103-111.

78. MULLIGAN, J. T., LONG, S. R. 1985. Induction of Rhizobium meliloti nodC ex-

pression by plant exudate requires nodD. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82: 6609-6613.

79. NAYADU, M., BENDER, C. L., BASSAM, B. J., SINCLAIR, M., ROLFE, B. G. 1987. Identification of host specificity regions determining the broad host range nodulation of Rhizobium strain NGR234. En: Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster. D. P. S. Verma & N. Brisson (eds.).

80. NOTI, J. D., DUDAS, B., SZALAY, A. A. 1985. Isolation and characterization of nodulation genes from Bradyrhizobium sp. (Vigna) strain IRc78. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7379-7383.

81. NUTI, M. P., LEPIDI, A. A., PRAKASH, R. K., SCHILPEROORT, R. A., CANNON, F. C. 1979. Evidence for nitrogen fixation (nif) genes on indigenous Rhizobium plasmids. Nature, 282: 533-535.

82. DROSZ, L., SVAB, Z., KONDOROSI, A., SIK, T. 1973. Genetic studies on Rhizobiophage 16-3. Genes and functions on the chromosome. Mol. Gen. Genet., 125: 341-350.

83. PHEIFFER, B. H., ZIMMERMAN, S. B. 1983. Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt or cohesive-end ligation of DNA or Deoxyribo-oligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solution. Nucleic Acids Res., 11: 7853-7871.

84. PHILIPS, D. A. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes.

Ann. Rev. Plant Physiol., 31: 29-49.

85. PLAZINSKI, J., ROLFE, B. G. 1985. Sym plasmid genes of Rhizobium trifolii expressed in Lignobacter and Pseudomonas strains. J. Bacteriol., 162 : 1261-1269.

86. PLAZINSKI, J., CEN, Y. H., ROLFE, B. G. 1985. General method for the identification of plasmid species in fast-growing soil microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 49: 1001-1003.

87. PRAKASH, R. K., ATHERLY, A. G. 1984. Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast growing Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 160: 785-787.

88. PRAKASH, R. K., HOOYKAAS, P. J. J., LEDEBOER, A. M., KIJNE, J. W., SCHILPERDORT, R. A., NUTI, M. P., LEPIDI, A. A., CASSE, F., BOUCHER, C., JULLIOT, J. S DENARIE, J. 1980. Detection, isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium. En: Nitrogen Fixation, vol. II. pp.139-163. W. E. Newton & W. H. Orme-Johnson (eds.). University Park Press. Baltimore.

89. PUVANESARAJAH, V., SCHELL, F. M., STACEY, G., DOUGLAS, C. J., NESTER, E. 1985. Role for 2-linked-beta-D-glucan in the virulence of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol., 164: 102-106.

90. PUTNOKY, P., KISS, G. B., OTT, I., KONDOROSI, A. 1983. Tn5 carries a streptomycin-resistance determinant downstream from the kanamycin-resistance gene.

Mol. Gen. Genet., 191: 288-294.

91. PUTNOKY, P., KONDOROSI, A. 1986. Two gene clusters of Rhizobium meliloti code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency. J. Bacteriol., 167: 881-887.

92. RAMAKRISHNAN, N., ATHERLY, A. G. 1986. Nod-linked host specific gene for soybean (pekin) nodulation in Rhizobium fredii USDA193. En: Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster. D.P.S. Verma y N. Brisson eds.

93. REDMOND, J. V., BATLEY, M., DJORDJEVIC, M. A., INNES, R. W., KUEMPEL, P. L. ROLFE, B. G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium. Nature, 323: 632-635.

94. ROBERTS, R. J. 1979. Directory of restriction endonucleases. Methods Enzymol., 68: 27-41.

95. RODRIGUEZ-QUINONES, F. 1986. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

96. RODRIGUEZ-QUINONES, F., BANFALVI, Z., MURPHY, P., KONDOROSI, A. 1986. Interspecies homology of nodulation genes in Rhizobium. Plant Mol. Biol., 8: 61-75.

97. ROLFE, B. G., GRESSHOFF, P. M., SHINE, J. 1980. Rapid screen for symbiotic mutants of Rhizobium and white clover. Plant Sci. Lett., 19: 277-284.

98. ROLFE, B. G., INNES, R. W., SCHOFIELD, P. R., WATSON, J. W., SARGENT, C. L. KUEMPEL, P. L., PLAZINSKI, J., CANTER-CREMERS, H., DJORDJEVIC, M. A. 1985. Plant-secreted factors induce the expression of Rhizobium trifolii nodulation and host-range genes. En: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Nitrogen Fixation Research Progress. pp. 79-85, H. J. Evans, P. J. Bottomley & W. E. Newton (eds.). Martinus Nijhoff Pub. Dordrecht/Boston/Lancaster.
99. ROSENBERG, C., BOISTARD, P., DENARIE, J., CASSE-DELBART, F. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet., 184: 326-333.
100. ROSSEN, L., SHEARMAN, C. A., JOHNSTON, A. W. B., DOWNIE, J. A. 1985. The nodD gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the nodA, E, C genes. EMBO J., 4: 3369-3373.
101. ROSTAS, K., KONDOROSI, E., HORVATH, B., SIMONCSITS, A., KONDOROSI, A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in rhizobia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 1757-1761.
102. ROTHSTEIN, S. J., JORGENSEN, R. A., POSTLE, K., REZNIKOFF, N. 1980. The inverted repeats of Tn5 are functionally different. Cell, 19: 795-805.
103. RUSSEL, P., SHELL, M. G., NELSON, K. K., HALVERSON, L. J., SIROTKIN, K. M. STACEY, G. 1985. Isolation and characterization of the DNA region encoding nodulation functions in Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol., 164: 1301-1308.

104. RUVKUN, G. B., AUSUBEL, F. M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 191-195.
105. RUVKUN, G. B., AUSUBEL, F. M. 1981. A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature, 289: 85-88.
106. SCIAKY, D., MONTOYA, A., CHILTON, M. D. 1978. Fingerprints of Agrobacterium Ti-plasmid. Plasmid, 1: 238-253.
107. SCOTT, K. F. 1986. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont Bradyrhizobium sp. (Parasponia). Nucleic Acids Res., 14: 2905-2919.
108. SCHOFIELD, P. R., RIDGE, R. W., ROLFE, B. G., SHINE, J., WATSON, J. M. 1984. Host-specific nodulation is encoded on a 14 Kb DNA fragment in Rhizobium trifolii. Plant Mol. Biol., 3: 3-11.
109. SCHOFIELD, P. R., WATSON, J. M. 1986. DNA sequence of Rhizobium trifolii nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding nodABC and nodFE. Nucleic Acids Res., 14: 2891-2903.
110. SELVARAJ, G., IYER, V. N. 1985. A small mobilizable IncP group plasmid vector packageable into bacteriophage λ capsids in vitro. Plasmid, 13: 70-74.
111. SHEARMAN, C. A., ROSSEN, L., JOHNSTON, A. W. B., DOWNIE, J. A. 1986. The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nodE encodes a polypeptide similar to

acylcarrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate. EMBO J., 5: 647-652.

112. SENGUPTA-GOPALAN, C., PITAS, J. W., THOMPSON, D. V., HOFFMAN, L. M. 1986. Expression of host genes during root nodule development in soybeans. Mol. Gen. Genet. 203: 410-420.

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

114. SPAINK, H. P., WIJFFELMAN, C. A., PEES, E., OKKER, R. J. H.; LUGTENBERG, B. J. J. 1987. Rhizobium nodulation gene nodD as a determinant of host specificity. Nature, 328: 337-340.

115. THOMASHOW, M. F., KARLINSEY, J. E., MARKS, J. R., HURLBERT, R. E. 1987. Identification of a new virulence locus in Agrobacterium tumefaciens that affects polysaccharide composition and plant cell attachment. J. Bacteriol., 169: 3209-3216.

116. TOROK, I., KONDOROSI, A. 1981. Nucleotide sequence of the Rhizobium meliloti nitrogenase reductase (nifH) gene. Nucleic Acids Res., 9: 5711- 5723.

117. TOROK, I., KONDOROSI, E., STEPKOWSKI, T., POSEAI, J., KONDOROSI, A. 1984. Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti nodulation genes. Nucleic Acids Res., 12: 9509-9524.

118. TRINICK, M J. 1980. Relationship amongst the fast-growing rhizobia of Lablab purpureus, Leucaena leucocephala, Mimosa spp., Acacia farnesiana and Sesbania grandiflora and their affinities with other rhizobial groups. J. Appl. Bacteriol., 49: 39-53.
119. TSIEN, H. C., DREYFUS, B. L., SCHMIDT, E. L. 1983. Initial stages in the morfogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of Sesbania rostrata. J. Bacteriol., 150: 888-897.
120. VERMA, D. P. S., LONG, S. R. 1983. The Molecular Biology of Rhizobium-legume symbiosis. Int. Rev. Cytol., Suppl. 14: 211- 245.
121. VESPER, S. J., MALIK, N. S. A., BAUER, W. D. 1987. Transposon mutants of Bradyrhizobium japonicum altered in attachment to host roots. Appl. Environ. Microbiol., 53: 1959-1961.
122. VINCENT, J. M. 1974. Root nodule symbiosis with Rhizobium. En: The Biology of Nitrogen Fixation. pp. 265-341. A. Quispel (ed.). North Holland Pub. Co. Amsterdam.
123. VINCENT, J. M. 1977. A Treatise on Dinitrogen Fixation, III. pp. 277-364. R. W. F. Hardy & W. S. Silver (eds.). John Wiley & Sons Inc. Nueva York.
124. YELTON, H. M., MULLIGAN, J. T., LONG, S. R. 1987. Expression of Rhizobium meliloti nod genes in Rhizobium and Agrobacterium backgrounds. J. Bacteriol., 169: 3094-3098.

125. ZAAT, S. A. J., WIJFFELMAN, C. A., SPAINK, H. P., VAN BRUSSEL, A., OKKER, R. J. H, LUGTENBERG, B. J. J. 1987. Induction of the nodA promoter of Rhizobium leguminosarum Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. J. Bacteriol. , 169: 198-204.