

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

24 JUN 20

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades.

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

IDENTIFICACION DE GENES DE Rhizobium phaseoli INVOLUCRADOS EN

LA NODULACION DE Phaseolus vulgaris.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTIGA-
CION BIOMEDICA BASICA PRESENTA

MARTHA VERONICA VAZQUEZ LASLOP

Cuernavaca, Morelos.

Abril, 1988.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION

Generalidades.....	1
Genética bacteriana de la simbiosis.....	5
Los genes <u>nod</u> comunes.....	6
Los genes <u>nod</u> específicos.....	11
Otros genes importantes.....	15

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	19
-------------------------------	----

MATERIALES Y METODOS

Cepas.....	23
Medios de crecimiento y condiciones de cultivo.....	23
Banco, bacteriófago y vehículos utilizados.....	23
Transformaciones y conjugaciones.....	24
Termoducción del bacteriófago.....	25
Minipurificación de cósmidos.....	26
Digestión con enzimas de restricción.....	26
Purificación de DNA cromosomal.....	27
Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	27
Hibridización de DNA-DNA tipo Southern.....	28
Crecimiento e inoculación de plantas.....	31
Purificación de bacterias de nódulos.....	31

RESULTADOS

Construcción de cepas.....	35
Mapeo de las inserciones.....	37
Fenotipo simbiótico de las mutantes.....	38
Localización de las inserciones en los genes <u>nodABCD</u> y <u>hsn</u> de <u>Rhizobium phaseoli</u>	40

DISCUSION.....	55
----------------	----

CONCLUSIONES.....	66
-------------------	----

REFERENCIAS.....	68
------------------	----

INTRODUCCION

Generalidades.

Las bacterias de la familia de las Rizobiáceas, interactúan con plantas de la familia de las leguminosas en una asociación simbiótica para formar estructuras llamadas nódulos donde se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_4^+).

Estas bacterias Gram negativas comprenden actualmente 4 géneros: Rhizobium, Bradyrhizobium, Phyllobacterium y Agrobacterium. Los tres primeros géneros son capaces de fijar nitrógeno. Las bacterias del género Agrobacterium no fijan nitrógeno. En el caso de los dos primeros géneros, las bacterias forman nódulos en las raíces y en algunos casos en los tallos de las plantas. Las especies del género Phyllobacterium forman nódulos en las hojas y las bacterias del género Agrobacterium producen hipertrofias en los tallos y las raíces de plantas dicotiledóneas. Se ha propuesto que el género Rhizobium conste de tres especies: R. leguminosarum con tres biovares (biovar trifolii, biovar phaseoli y biovar viciae); R. meliloti y R. loti. Con esto, las tres especies R. leguminosarum, R. trifolii y R. phaseoli quedarían reunidas en una misma especie. R. loti incluiría a los miembros de crecimiento rápido de los rhizobia "cowpea" y a las especies de R. lupinus. El nuevo género Bradyrhizobium contendría

únicamente a la especie R. japonicum que estaría constituida por lo que anteriormente se conocía por R. japonicum y los miembros de crecimiento lento de los rhizobia "cowpea" (Jordan, 1984) y R. fredii estaría formado por los rhizobia "cowpea" de crecimiento rápido. En este estudio a las especies de R. leguminosarum bv. viciae, trifolii y phaseoli se les llamará R. leguminosarum, R. trifolii y R. phaseoli respectivamente.

En este trabajo se analizará la información proveniente de estudios de las asociaciones entre los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium y sus respectivos hospederos.

Para que la asociación fijadora de nitrógeno se lleve a cabo, es necesario que las bacterias colonicen la superficie de la raíz y se unan a las células que van a formar los pelos radiculares (Bauer, 1981, Bhuvanewari et al., 1980 y Turgeon et al., 1982). En la mayoría de las leguminosas, la infección está restringida a este tipo de células que son susceptibles a la infección durante periodos muy cortos (6 horas) (Bhuvanewari et al., 1980). En los puntos de la raíz donde están emergiendo los pelos radiculares, se secretan compuestos flavonoides en altas concentraciones. Estos compuestos son necesarios para la activación de los genes de Rhizobium necesarios para la nodulación (Redmond et al., 1986), de los cuales se hablará más adelante. Los rhizobia responden liberando factores desconocidos de bajo peso molecular que pueden causar enroscamiento o distorsión de los pelos radiculares (Bhuvanewari et al., 1985) ó

la inducción de división celular en células corticales (Bauer et al., 1985).

La unión de las bacterias a las células de los pelos radiculares es mediada probablemente, por lectinas de origen vegetal (Dazzo et al., 1982). Una vez que se ha dado el reconocimiento, las bacterias degradan rápidamente la pared del pelo y colonizan el área (Ridge et al., 1986). El núcleo de la célula del pelo migra al sitio de infección (Dart, 1974) y se forma un hilo constituido de celulosa que es depositada por la planta (Kumarashinge et al., 1977). Las bacterias se dividen dentro del hilo, que penetra las distintas capas celulares de la raíz. Cuando el hilo de infección se encuentra en las células de la corteza externa, se induce una actividad meristemática a distancia de las células de la corteza interna que ya habían dejado de dividirse (Bisseling et al., 1977). Durante este proceso algunas células corticales quedan en estado poliploide. En este momento, la planta ha liberado factores sistémicos que impiden que se forme un número excesivo de nódulos (Pierce et al., 1983). Cuando las bacterias llegan a las células poliploides de la corteza interna de la raíz, el saco del hilo de infección se abre y la célula vegetal se llena de bacteroides que carecen de pared. Los bacteroides quedan rodeados por la membrana peribacteroidal que es de origen vegetal (Robertson et al., 1982). Para entonces, el tejido vegetal ya se ha diferenciado y ha formado el nódulo donde existen células infectadas por bacteroides, células no in-

fectadas que mantienen a las células infectadas, células que forman haces vasculares y células de transferencia de metabolitos (Newcomb, 1981). En este momento la planta posee una serie de proteínas específicas del nódulo conocidas como nodulinas (Legocki et al., 1980, Bisseling et al., 1983, Lang-Unnasch et al., 1985 y Campos et al., 1987), entre las cuales se encuentran descritas alrededor de 20 (Legocki et al., 1980, Govers et al., 1985). Únicamente se conoce la función de unas cuantas como la leghemoglobina (Verma et al., 1976), el polipeptido γ de la glutamino sintetasa (Lara et al., 1984), la uricasa (Bergmann et al., 1983) y la sacarosa sintetasa de nódulo (Thummler et al., 1986). La función del resto es desconocida.

En los bacteroides se induce la actividad de fijación de nitrógeno, mientras que en el citoplasma de la célula vegetal que rodea a los bacteroides aumenta el nivel de la leghemoglobina y de las enzimas responsables de la asimilación de amonio. Estas últimas transforman el amonio excretado en compuestos aminados que son transportados del nódulo a otras partes de la planta por el xilema. Otras enzimas son responsables del metabolismo de fotosintatos suministrados a los nódulos a través del floema. Algunos de los productos de este metabolismo son utilizados por los bacteroides como fuente de energía para mantener la fijación de nitrógeno.

El tipo de desarrollo de los nódulos puede ser determinado, donde el crecimiento es radial debido a que el meristemo se en-

cuentra en el centro del tejido, produciendo nódulos esféricos como en la asociación Phaseolus vulgaris-Rhizobium phaseoli, ó indeterminados donde el crecimiento es longitudinal debido a que el meristemo se encuentra en la zona distal a la raíz y el nódulo es cilindrico. Estos nódulos se encuentran por ejemplo en las asociaciones entre Pisum sativum y R. leguminosarum (Robertson y Farnden 1980, Newcomb, 1981).

Dada la facilidad de manipulación de las bacterias en el laboratorio, el conocimiento del papel que juega el microorganismo en la asociación, es mucho más profundo que el que se refiere a la planta. Desde el punto de vista genético, existe una gran cantidad de información. La más relevante para este trabajo se resumirá en la siguiente sección.

Genética Bacteriana de la Simbiosis.

El estudio genético de la simbiosis es complejo, ya que el número de genes conocidos involucrados en el proceso, es cada vez mayor.

En las bacterias del género Rhizobium mucha de esta información, está contenida en megaplásmidos llamados simbióticos (pSim) (revisado en Djordjevic et al., 1987a). En el género Bradyrhizobium esta información se encuentra en el cromosoma (revisado en Djordjevic et al., 1987a).

Hasta el momento, principalmente existen 3 grupos de genes simbióticos: los genes de nodulación (nod), los genes de fijación de nitrógeno (fix) y los genes de la nitrogenasa (nif). También se ha observado que algunos genes necesarios para síntesis de exopolisacáridos son requeridos para las primeras etapas de la nodulación. Sin embargo algunos de estos genes son cromosomales y otros son plasmídicos. Algunos genes de Rhizobium que son análogos funcionales de los genes de Agrobacterium tumefaciens, chvA y chvB, son indispensables para la formación de hilos de infección y de nódulos con bacteroides (revisado en Djordjevic et al., 1987a). Para este trabajo se resumirá la información genética de los genes nod comunes y los específicos.

Los Genes nod Comunes.

Estos genes se requieren para el enroscamiento de los pelos radiculares, para la estimulación de la síntesis del hilo de infección y para la inducción de la actividad meristemática de las células radiculares. Cuatro de estos genes, los genes nod A, B, C y D se han descrito para múltiples rizobiáceas como R. meliloti, R. leguminosarum, R. trifolii, R. phaseoli, R. fredii, Rhizobium sp. de amplio rango de huésped MPIK3030, Bradyrhizobium japonicum, Bradyrhizobium sp. (Vigna), Bradyrhizobium sp. (Parasponia) y nod C en Rhizobium sp. (Sesbania) (revisado en Martínez et al., enviado). Estos genes se encuentran repre-

sentados en la fig. 1.

Los fenotipos simbióticos alterados, causados por mutaciones en cualquiera de estos genes, pueden ser complementados al introducir la copia normal del gene mutagenizado, aún cuando esta copia provenga de una especie distinta. Esto indica una gran conservación de la funcionalidad de los productos de estos genes en las diversas especies de Rhizobium y Bradyrhizobium y por lo tanto se les ha llamado genes nod comunes.

Los genes nod comunes se han estudiado principalmente en R. meliloti, en R. leguminosarum y en R. trifolii. Estos estudios incluyen el aislamiento y caracterización de mutaciones, la determinación de la secuencia de los genes, la construcción de fusiones génicas para analizar la regulación y el marcaje con anticuerpos de los productos de los genes. Un resumen de la información conocida hasta el momento, se encuentra en la Tabla 1 (revisado en Rossen et al., 1987).

Las mutaciones en los genes nodABC y D en R. leguminosarum y en R. trifolii y en los 3 primeros en R. meliloti causan fenotipos Hac- (no hay enroscamiento del pelo) y no se forman nódulos (fenotipo Nod-). En R. meliloti, mutaciones en nodD causan una disminución en la eficiencia de nodulación, así como un retraso en la aparición de los nódulos, en ciertas plantas. Esto se debe a que nodD se encuentra reiterado en el plásmido Sim de R. meliloti (revisado en Rossen et al., 1987). Se ha demostrado que dos de las tres copias de este gene encontradas en

R. meliloti son funcionales y necesarias para una nodulación óptima en Medicago sativa (Gottfert et al., 1986). También existen varias copias del gene nodD en R. fredii, R. trifolii, R. phaseoli y en Rhizobium sp. MPIK3030 y se ha postulado que los productos de las diferentes copias de nodD en una especie, pueden responder particularmente a los compuestos estimuladores o inhibidores de la planta, como se verá más adelante (revisado en Martinez et al., enviado).

El producto del gene nodA se encuentra en la membrana citoplásmica de la bacteria (Egelhoff et al., 1985).

El producto de nodC es una proteína hidrofóbica. Datos inmunológicos y bioquímicos indican que su localización es membranal y se sugiere que es una proteína involucrada en la transmisión de señales (revisado en Djordjevic et al., 1987a).

Los genes nodABC están organizados como operón cuya expresión está reprimida cuando la bacteria está en vida libre. En contraste, la expresión de nodD es constitutiva en la mayoría de las especies estudiadas y es autorregulada en R. leguminosarum (revisado en Rossen et al., 1987). El producto de nodD es el responsable de la activación de la transcripción de los genes nod comunes y actúa junto con compuestos fenólicos de la planta que en la mayoría de los casos son flavonas hidroxiladas o flavanonas. Estos compuestos se liberan en la zona de emergencia de los pelos radicales y los genes nod se expresan minutos después de esta liberación (Djordjevic et al., 1987c en

Djordjevic et al., 1987a). Existen también compuestos de la planta que inhiben la transcripción de los genes nod. La cumarina umbeliferona y ciertos flavanoles e isoflavonoides tienen un efecto inhibitorio que parece ser competitivo con los compuestos activadores en su entrada a la bacteria ó en su interacción con el producto de nodD (revisado en Rossen et al., 1987, y en Djordjevic et al., 1987a). Las fluctuaciones en las concentraciones de los compuestos activadores e inhibidores podrian ser las responsables del control estricto que la planta ejerce en el número de nódulos (revisado en Djordjevic et al., 1987a). Sin embargo, Yelton et al., 1987, han demostrado que la inducción de nodC y la expresión de nodD de R. meliloti es normal en el fondo genético de otros rhizobia e incluso de Agrobacterium tumefaciens pero no en Escherichia coli, Xanthomonas campestris o Pseudomonas savastanoi, lo cual podría sugerir que se requieren otros genes además de nod D, A, B y C para la respuesta de los genes nod a la presencia de compuestos vegetales.

El producto de nodD puede restablecer el fenotipo Nod- de mutantes en este gene aún interespecificamente. Sin embargo, la sustitución del gene nodD de una especie por el de otra no es exactamente equivalente, pues esta sustitución puede cambiar el rango de especificidad de la bacteria receptora. Esto indica que los diversos productos de los genes nodD de cada especie, pueden tener distintas interacciones con los compuestos activadores o inhibidores antes mencionados (revisado en Rossen et al., 1987).

Al hacer la secuencia de los promotores de los genes inducidos por flavonas, se ha encontrado una caja "nod" en los rhizobia de crecimiento rápido y lento.

El producto de nodD tiene homología con la proteína araC de Escherichia coli en el dominio de reconocimiento de DNA, por lo que se cree que el producto de nodD interactúa tanto con los productos de la planta como con la caja "nod" para la regulación de la expresión de los genes nod. Por otro lado los genes nodABC de R. trifolii son inducibles sobre todo en fase de crecimiento logarítmica temprana y en otras fases la respuesta se reduce o es nula (Djordjevic et al., 1987b), a pesar de la constitutividad de la expresión del gene nodD.

En R. leguminosarum se han encontrado otros dos genes nod después del extremo 3' del gene nodC. El gene nodI cuyo producto se parece a las proteínas de membrana interna de transporte dependiente de ATP y nodJ cuyo producto es hidrofóbico y también está asociado a membrana (revisado en Rossen et al., 1987). Las mutaciones en estos genes afectan levemente el inicio del proceso simbiótico, así como el número de nódulos (revisado en Djordjevic et al., 1987a). En R. trifolii los genes de la región II son similares funcionalmente a los genes nodIJ de R. leguminosarum. Las mutantes de R. trifolii en esta región provocan un fenotipo de hiperenrollamiento de los pelos (fenotipo Hac^{**}) y hacen pocos nódulos, retrasados aproximadamente 24 horas. Estos nódulos carecen de bacterias. La expresión de estos genes requiere de la

presencia de las flavonas secretadas por la planta. Estas mutantes pueden ser complementadas por regiones similares de R. leguminosarum y R. meliloti (revisado en Djordjevic et al., 1987a).

Los Genes nod Especificos.

Estos genes se han llamado así, pues los fenotipos Nod-causados por mutaciones en ellos, no pueden ser restituidos por la introducción de los genes correspondientes de otras especies de Rhizobium a pesar de que en ocasiones, éstos son altamente homólogos. Por otro lado, estos genes son necesarios para ampliar el espectro de infección de una cepa específica. Es por esto que también se les llama genes hsn o genes de nodulación específica de un huésped determinado.

Los genes nodE y E (hsnA y B) existen en R. leguminosarum y R. trifolii y en R. meliloti (revisado en Rossen et al., 1987) y existen secuencias homólogas a nodE en R. fredii, Rhizobium sp. MPIK3030, pero no en R. phaseoli, R. lupini ni en B. japonicum (revisado en Martinez et al., sometido) (fig. 1).

La expresión de nodE está regulada por nodD. El producto de este gene tiene un posible sitio de unión a pantotenato, lo que sugiere que podría estar relacionado con una proteína acarreadora de acilos y se ha sugerido que pudiera estar involucrada en la acetilación ó síntesis de ácidos grasos o lipopolisacáridos. La

función del producto de nodE es desconocida.

Curiosamente, las mutaciones en cualquiera de estos dos genes en R. trifolii causan un fenotipo Nod- en trébol pero amplían su espectro de infección, permitiéndole ahora nodular chicharo aunque deficientemente. Una posible explicación de estos datos es que los productos normales de estos genes o los factores que resulten de su presencia, favorezcan el reconocimiento de los dos organismos entre los que se realiza la asociación normalmente, pero impidan que la bacteria sea reconocida por plantas de otras especies, o incluso que se genere un rechazo de la planta a las bacterias que no lleven la señal de reconocimiento adecuada (revisado en Rossen et al., 1987).

Los genes nodFE de R. leguminosarum y R. meliloti son muy homólogos por secuencia nucleotídica a pesar de que se les ha asignado el papel de conferir la especificidad de la bacteria por su hospedero (revisado en Djordjevic et al., 1987a).

Los genes nodG (hscC) y nodH (hscD) se describieron en R. meliloti (Horvath et al., 1986) y no se han encontrado secuencias homólogas en R. trifolii, ni en R. phaseoli ni en R. leguminosarum, aunque Spaink et al., 1987, describieron en R. leguminosarum una región nod distinta a las descritas, que según ellos podría ser comparable a las regiones IV y V de R. trifolii (fig. 1) y a los genes nodG y nodH de R. meliloti.

Las mutantes en los genes nodFEG presentan un fenotipo de nodulación tardía y una capacidad limitada para hacer hilos de

infección en algunas cepas de *R. meliloti* (Horvath et al., 1986), aunque en otras, las inserciones en nodG no causan un fenotipo Nod alterado (Swanson et al., 1987).

Las mutantes en el gene nodH en *R. meliloti* presentan fenotipos Hac-, Nod-, sin embargo son capaces de nodular dos especies de Vicia. Este gene se transcribe en sentido inverso a los genes nodFEG (Horvath et al., 1986).

Por comparaciones de las secuencias de aminoácidos se ha encontrado que el producto de nodG tiene homología significativa con la deshidrogenasa de ribitol de Klebsiella aerogenes y se ha hipotetizado que la planta provee a las bacterias invasoras con algún poliol como fuente de carbono; la capacidad que tenga la bacteria para catabolizar este compuesto afectaría la colonización y el crecimiento en los alrededores de la raíz (revisado en Djordjevic et al., 1987a).

Los chícharos primitivos (Cv. Afganistán) no pueden ser nodulados por las variedades convencionales de *R. leguminosarum*, pero una cepa llamada TOM nodula a este hospedero pues posee un sólo gene (nodX) en su plásmido Sim que no tiene homólogo en las cepas convencionales de este biovar (revisado en Rossen et al., 1987).

Por análisis de la secuencia nucleotídica se han descrito otros tres genes. nodK en *R. parasponiae* precede a nodA y probablemente se cotranscribe con nodABC. Este gene no se encuentra en rhizobia de crecimiento rápido. Los otros dos, nodL y M se

describieron en R. leguminosarum situados antes de nodE (Fig. 1). El amino terminal del producto de nodM es homólogo a un gene que codifica para una amidofosforibosil transferasa. La función de los productos de nodK, de nodL y de nodE, es desconocida hasta el momento (revisado en Rossen et al., 1987).

En R. trifolii se han descrito los genes nodM y nodN y sus productos están relacionados con la eficiencia de nodulación de trébol blanco. Los productos de estos genes controlan el patron de acetilación y la cantidad de 3-hidroxi-butirato en los polisacáridos ácidos capsulares (Dazzo et al., 1988).

Swanson et al. (1987), describen una mutación (nod216) en una zona arriba de nodG en R. meliloti que ocasiona una reducción en el número de nódulos, así como un retraso en la aparición de los mismos.

Recientemente Nayudu y Rolfe (1987) y Lewin et al. (1987), han aislado varios genes de especificidad de la cepa de Rhizobium NGR234 que es capaz de nodular a una gran cantidad de leguminosas tropicales y a plantas del género Parasponia que no pertenece a la familia de las leguminosas. Lewin et al. (1987), han descrito cuando menos tres regiones hsn diferentes. HsnI está localizada cerca del gene nodD, HsnII está ligada a los genes nifHDK y HsnIII al gene nodC. La región HsnIII puede complementar mutaciones en el gene nodH de R. meliloti, pero ninguna de las tres puede complementar mutaciones en nodF o E en R. meliloti. HsnII y HsnIII presentan homología con la caja nod a diferencia

de HsnI, lo cual sugiere que los mecanismos de regulación de HsnI son distintos a los de HsnII y III. Estos estudios demuestran que existen diferentes zonas importantes para conferir la especificidad de la bacteria para nodular diferentes plantas.

Otros genes importantes.

Rhizobium sp. produce una gran cantidad de polisacáridos: capsulares (CPS), exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) y β -1-2-glucanos. El papel que juegan estos compuestos en la nodulación es poco claro. Sin embargo se han aislado mutantes defectuosas en la formación de exopolisacárido ácido que son incapaces de formar hilos de infección aunque sí hay actividad meristemática y se forman pseudonódulos (Van den Bosch et al., 1986).

Otro tipo de mutantes aisladas son incapaces de producir el lipopolisacárido principal; forman hilos de infección abortivos y de los nódulos formados se pueden recuperar bacterias pero no bacteroides. Es probable que este lipopolisacárido influya sobre la persistencia del hilo de infección (revisado en Djordjevic et al., 1987a).

Finalmente Govers et al. (1986) y Moerman et al. (1987), han demostrado que la transferencia de una región nod de 10 kb a cepas sin plásmido simbiótico en R. leguminosarum pueden causar la expresión de nodulinas en Pisum sativum (chicharo) y en Vicia

sativa (arveja), y que las raíces de estas plantas infectadas con una cepa de Agrobacterium con el plásmido Sim de R. leguminosarum, expresan un gene de una nodulina temprana (ENod2) pero no otros. Estos resultados muestran que se requieren por lo menos dos señales en la inducción de la expresión de nodulinas. La presencia de los genes nod es indispensable para disparar la primera respuesta aunque para la segunda, es decir para la expresión de las otras nodulinas se requieren otros genes bacterianos localizados en el plásmido simbiótico, o incapaces de expresarse en Agrobacterium, o bien de genes localizados en el cromosoma.

GENE	OBSERVACIONES	FENOTIPO DE LAS CEPAS ^a		
		<u>R. legu- minosarum^b</u>	<u>R. trifolii^b</u>	<u>R. meliloti^b</u>
<u>nodA</u>	Citoplásmico	Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻
<u>nodB</u>		Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻
<u>nodC</u>	Unido a membrana	Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻
<u>nodD</u>	Regulador	Hac ⁻	Hac ⁻	Retraso
<u>nodE</u>		Retraso	Retraso	Retraso
			Nod ⁺	
			(chicharo)	
<u>nodF</u>	Homología con una proteína acarreadora de acillos	?	Retraso	Retraso
			Nod ⁺	
			(chicharo)	Retraso
<u>nodG</u>	Homología con la deshidrogenasa de ribitol	NI	NI	Retraso
		Posiblemente en ?	Región IV? ²	
<u>nodH</u>		NI Posible en ²	NI .Región V?	Hac ⁻
<u>nodI</u>	Asociado a membrana; homología con un componente de sistema de transporte	Retraso	NI	NI
			.Región II?	
			Hac ⁺⁺	
			Nod ^{+/+}	
<u>nodJ</u>	Probablemente asociado a membrana	Retraso	NI .Región II?	NI
			Hac ⁺⁺ , Nod ^{+/+}	
<u>nodL</u>		?	NI	NI
<u>nodM</u>	Homología con asidoferribosil transferasa	?	NI	NI
<u>nodX</u>	Capacidad de nodulación de chicharos Afganistán; probablemente asociado a membrana	Nod ⁻ en chicharos Afganistán		

Hac⁻, no hay enroscamiento del pelo ni induce nódulos; Nod⁻, no nodula; retraso, retraso en la iniciación de la nodulación y hay número reducido de nódulos; NI, gene no identificado; ?, no hay mutaciones aisladas.

a. Todas estas mutaciones son causadas por inserción de transposones y probablemente tengan un efecto polar sobre otros genes.

b. Las pruebas de nodulación en R. leguminosarum en R. trifolii y en R. meliloti se llevaron a cabo en chicharos, en trébol blanco y en alfalfa, respectivamente.

1. Djordjevic et al., 1987.

2. Spaink et al., 1987.

TABLA 1

(Adaptada de Roszen et al., 1987)



● Promotores con caja nod

— 1 Kb

FIG 1 LOS GENES nod EN DIFERENTES RIZOBIACEAS

1. Ransen et al., 1987.
2. Djordjevic et al., 1986.
3. Djordjevic et al., 1987.
4. Swanson et al., 1987.
5. Este trabajo.
6. Niewkoop et al., 1987.
7. Scott, 1986.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

Estoy interesada en el estudio de la asociación entre Rhizobium phaseoli y Phaseolus vulgaris L. Cv. Negro Jamapa. Con la finalidad de determinar los loci del plásmido Sim de la cepa R. phaseoli CE3 necesarios para la formación y desarrollo de los nódulos, se construyó un banco a partir de DNA total de la cepa mencionada y se aislaron dos cósmidos capaces de formar nódulos inefectivos (que no fijan nitrógeno) en una cepa isogénica de la CE3 curada del plásmido Sim que per se es incapaz de hacer nódulos (Cevallos et al., enviado).

Estos dos cósmidos son los denominados pSM927 y pSM991 (fig. 2). Por datos de hibridización DNA-DNA, se demostró que el cósmido pSM991 contiene secuencias homólogas a los genes nodABC de Rhizobium meliloti en una banda de 6.8 Kb de EcoRI y a un probador que contiene a uno de los genes nodD de R. meliloti en una banda de 5.5 Kb de EcoRI (Cevallos et al., enviado).

Si este cósmido se introduce a cepas de R. meliloti que contienen inserciones de Tn5 en nod A, B ó C es capaz de restaurar el fenotipo Nod- causado por estas inserciones en plantas de alfalfa (Cevallos et al., enviado).

El cósmido pSM991 también contiene la región nifA con el operón nifHDK completo (Cevallos et al., enviado).

A partir de este cósmido se construyeron delecciones y uno de

estos derivados, el pSM991.25 conservó la capacidad de nodular Phaseolus vulgaris. El pSM991.25 (Fig. 2) contiene, entre otras, las bandas de 5.5 y 6.8 Kb de EcoRI que llevan como ya se mencionó, secuencias homólogas a un probador con el gene nodD de R. meliloti y los genes nodABC, respectivamente. Por otro lado, cuando este cósmido se introduce a una cepa silvestre de R. meliloti, que normalmente es incapaz de nodular al frijol, le confiere ahora la capacidad de formar estructuras semejantes a nódulos en las raíces de P. vulgaris. Este hecho permite suponer que el pSM991.25 contiene el o los genes involucrados en determinar la especificidad por el hospedero (genes hcn). Esta información está contenida en un fragmento de 3.5 Kb de EcoRI ya que otro cósmido, derivado también del pSM991, que carece de esta banda pero tiene todas las demás del pSM991.25, es incapaz de formar estas estructuras nodulares en frijol, al ser introducido en una cepa silvestre de R. meliloti (Cevallos et al., enviado).

En resumen al iniciar este trabajo, sabíamos que el pSM991.25 contenía secuencias homólogas a un probador con el gene nodD de R. meliloti, los genes nodABC y probablemente el o los genes hcn para nodular frijol.

Este trabajo se realizó con el fin de determinar directamente las zonas genéticas importantes de R. phaseoli para la formación y desarrollo de los nódulos.

Dado que esta información ya se conoce para otras Rizobiáceas, un objetivo más fué establecer qué tan similar es

Rhizobium phaseoli a otras Rizobiáceas de crecimiento rápido o lento desde este punto de vista.

Finalmente, ya que mi interés es también estudiar el proceso de la simbiosis en la planta, se consideró que la construcción de mutantes bacterianas que se detuvieran en distintas etapas del proceso, serían de gran utilidad para poder analizar con mayor facilidad el papel de la planta en la asociación simbiótica.

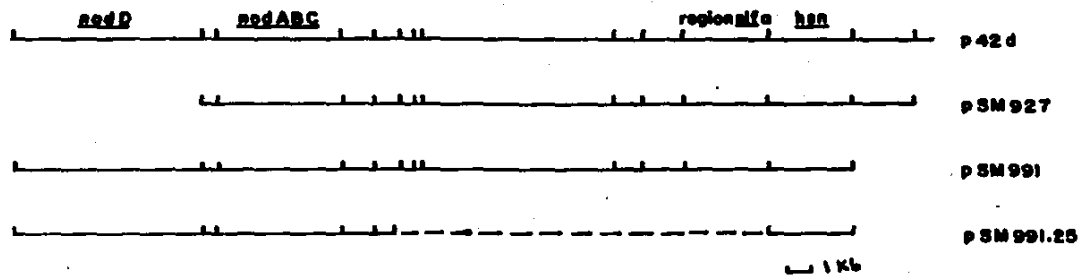


FIG. 2 COSMIDOS CONSTRUIDOS A PARTIR DEL pSym de *R. phaseoli*. CE 3. (Cevallos et al., en prep.)

MATERIALES Y METODOS.

Cepas

Las cepas bacterianas utilizadas se encuentran en la Tabla 2.

Medios de crecimiento y condiciones de cultivo

Las cepas derivadas de Escherichia coli se crecieron en medio Luria (Miller, 1972) en temperaturas de 30° o 37°C, según el caso. Las cepas derivadas de Rhizobium phaseoli se crecieron en medio PY (Noel et al., 1984) a 30°C.

Los antibióticos se utilizaron en los casos pertinentes en las siguientes concentraciones: cloranfenicol (Cm) 30µg/ml, tetraciclina (Tc) 10 µg/ml, kanamicina (Km) 30µg/ml, estreptomycinina (Sm) 100µg/ml, para E. coli. Para R. phaseoli, las concentraciones de los antibióticos utilizados según el caso fueron: rifampicina (Rif) 50µg/ml, Cm 15µg/ml, Tc 5 µg/ml, Km 30 µg/ml.

Banco, bacteriófago y vehículos utilizados

Estos vehículos se encuentran en la Tabla 2.

El banco de cósmidos de donde fué aislado el pSM991, se construyó a partir de DNA total extraído de la cepa Rhizobium

phaseol1 CE3 (Cevallos et al., enviado).

El bacteriófago MudiIPR13 se utilizó para hacer las inserciones en el pSM991.25 y es un derivado del bacteriófago MudiIPR3 (Ratet et al., 1986), donde la secuencia que codifica para la fosfotransferasa de neomicina (nptI) se sustituyó por el operón lac (Fig. 3).

Transformaciones y conjugaciones

Las transformaciones se llevaron a cabo según Maniatis et al., 1982 con las siguientes modificaciones, como se describe a continuación: se inocularon 2 ml de medio Luria con la cepa que se deseaba transformar y se dejó crecer a saturación. Con 0.1 ml de este cultivo se inocularon 30 ml de medio Luria y se incubó a 30° o 37°C, según fuera conveniente, con agitación. Cuando este cultivo llegó a tener 0.6 de densidad óptica a 600 nm se enfrió en hielo durante 15 min. Se centrifugó 5 min a 5000 rpm y el botón celular se lavó con 15 ml de MgCl₂ 50 mM estéril. Se volvió a centrifugar 5 min a 5000 rpm y el botón se resuspendió en buffer de transformación fresco (CaCl₂ anhidro 75 mM, MgCl₂ 5 mM y TrisHCl 5 mM pH 7.4). Se incubó en el buffer de 15 a 20 min en hielo y se centrifugó 5 min a 5000 rpm. Se resuspendió en 2 ml de buffer de transformación y se tomaron 0.2 ml de células para añadirles de 10-100 ng de DNA. Las células con el DNA se incubaron durante 1 h en hielo agitando suavemente de vez en cuando

y se dió un choque térmico de 2 min a 42°C. Se añadió 1 ml de medio Luria y las células se incubaron durante 1 h con agitación a 30° o 37°C según el caso. Se plaquearon en medio selectivo de 0.1 a 0.2 ml de células y se incubaron a 30° o 37°C según el caso.

Las conjugaciones se llevaron a cabo en medio líquido o en parches según Quinto et al., 1985.

Termoinducción del bacteriófago

La termoinducción del bacteriófago se llevó cabo según Murooka et al., 1981 y Groisman et al., 1986. Antes de iniciar el experimento se probó la termosensibilidad de varias colonias aisladas de la cepa MC4100 Mucts MudIIPR13/pSM991.25. Con una de ellas se inocularon 2 ml de medio Luria Cm Tc y el cultivo se dejó crecer a saturación a 30°C.

Se tomaron 0.1 ml de este cultivo y se inocularon 10 ml de medio Luria con CaCl₂ 5mM y MgSO₄ 200 mM sin antibióticos.

Este cultivo se creció a 30°C con agitación aproximadamente 3 h hasta que alcanzó 0.22 unidades de densidad óptica a 540 nm. Cuando esto sucedió, el cultivo se pasó a incubar a 37°C con agitación durante 20 min y posteriormente a 42°C con agitación de 40 a 80 min hasta que se observó lisis celular. En este momento se añadieron cloroformo, MgSO₄ y CaCl₂ a concentraciones finales de 1%, 2 mM y 20 mM respectivamente.

Una vez hecho esto, el cultivo se centrifugó 3 min a 10000 rpm y se obtuvo el sobrenadante.

Al mismo tiempo se creció un cultivo de la cepa M8820 Mu en medio Luria con CaCl_2 5mM y MgSO_4 10mM sin antibióticos. Cuando el cultivo llegó a una densidad de 1.5×10^8 células/ml se concentró 10 veces en Luria CaCl_2 5 mM y MgSO_4 10 mM. Cuando se tuvo el lisado del bacteriófago se pusieron en un tubo 0.1 ml de cultivo de la cepa M8820 Mu y 0.1 ml del lisado y otro tubo con 0.01 ml de lisado (multiplicidad de infección 10 y 1 respectivamente), así como un tubo control sin lisado. Todos los tubos se incubaron a 30°C sin agitación durante 30 min. Posteriormente se añadieron 2 ml de medio Luria a cada tubo y se incubaron con agitación 75 min a 30°C. Finalmente las células se lavaron una vez con NaCl 10 mM, se resuspendieron en 0.4 ml de NaCl 10 mM y se plaquearon 0.1 ml en medio Luria Cm CaCl_2 5 mM.

Minipurificación de cósmidos

Se utilizó el método reportado por Birnboim et al., 1979, sólo que se eliminaron todos los tiempos de incubación y la pastilla se resuspendió en 50 μ l de agua estéril.

Digestión con enzimas de restricción

La cantidad de DNA obtenida en las purificaciones se estimó

corriendo una alicuota en minigeles de agarosa al 1% de 7 cm de longitud y 1.5 mm de grosor en buffer Tris-boratos 0.5X (Maniatis et al., 1982) a 150 V.

Se tomó la cantidad adecuada y se digirió con la enzima de restricción pertinente en los buffers que sugieren los proveedores de cada una de ellas. El grado de digestión de las reacciones se observó también por medio de electroforesis en minigeles.

Las reacciones se detuvieron añadiendo la mezcla de parada de Maniatis et al., 1982.

Purificación de DNA cromosomal

Se utilizó el método de Quinto et al., 1982 sin modificaciones.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1%, de 3 mm de grosor y 15 cm de longitud. Se corrieron en buffer Tris-boratos-EDTA (TBE, Maniatis et al., 1982) a 80 V durante 8 h a 4°C. Los geles se tñieron con una solución de bromuro de etidio (0.4 µg/ml) y se observaron con luz ultravioleta.

Hibridización de DNA-DNA tipo Southern (Quinto et al., 1982)

Transferencia

Las muestras de DNAs cromosomales o de cósmidos se corrieron en los geles ya descritos, se tiñeron, se fotografiaron y se trataron para transferirlos a filtros de nitrocelulosa. Este tratamiento se realizó incubando los con agitación en las siguientes soluciones: HCl 0.25 N, 2 veces, 15 min cada una; NaOH 0.5 M NaCl 1.5 M 2 veces, 15 min cada una y finalmente en Tris-HCl 0.5 M pH 7.4 NaCl 1.5 M 2 veces, 30 min cada una. Los geles se humedecieron en SSC 6X (Maniatis et al., 1982) y se pusieron en contacto con filtros de nitrocelulosa que previamente habían sido hervidos 10 min en agua estéril y posteriormente humedecidos en SSC 6X. Los filtros se colocaron por arriba y por debajo del gel evitando atrapar las burbujas de aire; después de los filtros se pusieron de cada lado dos hojas de papel Whatman 3MM secas, del mismo tamaño que los filtros y el gel y finalmente, también de ambos lados, una pila de papel absorbente de aproximadamente 10 cm de altura. A todo esto se le colocó encima un vidrio y sobre el vidrio un peso de aproximadamente 0.5 Kg. Las transferencias se dejaron entre 10 y 12 horas y posteriormente los filtros se hornearon a 80°C al vacío. Se guardaron en bolsas de hibridización selladas hasta el momento de usarlos.

Prehibridización

Para las hibridizaciones homólogas al 100% se prehibridizó con 10 ml de una solución que contenía solución Denhardt 10X, SSC 5X, buffer fosfatos 100 mM pH6.8, DNA de tимо 50 µg/ml (Maniatis et al., 1982).

Para las hibridizaciones heterólogas se prehibridizó con 10 ml de solución que contenía formamida al 30%, SSC 4X, Tris 100 mM pH 7.4, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, solución Denhardt 5X y DNA de timento de ternera 50 µg/ml que se añadió previamente hervido durante 10 min (Maniatis et al., 1982).

Hibridización

Se cambió la solución de prehibridización por la de hibridización que es igual a la primera solo que además contiene el probador marcado radiactivamente. Este se desnaturaliza por calentamiento (10 min en agua hirviendo) y se pone en hielo inmediatamente. Finalmente se añade a la solución de hibridización correspondiente y se sella la bolsa evitando las burbujas.

En el caso de las hibridizaciones de secuencias homólogas, estas se llevaron a cabo a 65°C. Las heterólogas se llevaron a cabo a 42°C.

Lavado

Los filtros de las hibridaciones homólogas fueron lavados con una solución de SSC 0.1X y 0.1% de SDS, una vez a temperatura ambiente, durante 15 min. Posteriormente se lavó con esta misma solución 3 veces durante 15 min cada vez a 55°C y finalmente con una solución de SSC 0.1X una vez durante 15 min a 55°C.

Los filtros de las hibridaciones heterólogas fueron lavados con una solución de SSC 2X y 0.1% de SDS, 3 veces a temperatura ambiente, 15 min cada vez. Posteriormente con esta misma solución se lavó una vez durante 15 min a 55°C y finalmente con una solución de SSC 2X una vez durante 15 min a temperatura ambiente.

Probadores

Cuando se utilizaron cósmidos completos, se purificaron por el método de minipurificación descrito anteriormente.

Cuando se utilizaron fragmentos purificados de plásmidos o cósmidos se utilizó el método de Lizardi et al., 1984 sin modificaciones.

El marcaje radiactivo de los probadores se hizo utilizando el método de "traducción de mella" con ^{32}P dCTP descrito en Maniatis et al., 1982.

Crecimiento e inoculación de plantas

Las semillas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) Cv. Negro Jamapa se lavaron en agua varias veces y se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por 15 min.

Las semillas se pregerminaron durante 2 días en condiciones estériles a 30°C y una vez que el hipocotilo media aproximadamente 1 cm, se pasaron a matraces que contenían solución nutritiva Fahreus sin nitrógeno (Broughton et al., 1971) y agar al 0.7%. Las semillas, entonces se incubaron en la oscuridad a 30°C durante dos días más y posteriormente se inocularon con 1 ml de cultivos de la cepa correspondiente crecidos a saturación en medio PY sin antibióticos (aproximadamente 1×10^{11} células/ml. Cada cepa se inoculó por duplicado en cada experimento. Las plantas se incubaron a 26°C con periodos de luz oscuridad de 12 h con una intensidad luminosa de , y humedad relativa de 60%.

Purificación de bacterias de nódulos

Para corroborar que la cepa que se inoculó fue la misma que formó los nódulos en los experimentos con plantas, de cada planta nodulada se cortaron 3 nódulos y se esterilizaron superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio 10% durante 5 min.

Los nódulos se enjuagaron varias veces con agua estéril en cajas de agar con medio PY sin antibióticos. Las bacterias extraídas de los nódulos, se estriaron en este medio. Las cajas se incubaron a 30°C. Cuando aparecieron colonias aisladas, se parcharon 10 colonias obtenidas de cada nódulo, en medios selectivos para los marcadores de la cepa con la que se había inoculado la planta.

CEPA	GENOTIPO Y CARACTERISTICAS RELEVANTES	FUENTE o REFERENCIA
<u>E. coli</u>		
MC4100 (Muc ^{ts})	F- <u>araD139</u> (<u>lacI</u> PQZYA- <u>argF</u>) U169 <u>rpsL150</u> <u>relA1</u> <u>flb5301</u> <u>ptsF25</u> <u>deoC1</u> . Lisógena de Muc ^{ts} 62.	Casadaban, 1976
H8B20 (Mu)	F- <u>araD139</u> (<u>ara-leu</u>)7697 (<u>proAB-argF-lacI</u> PQZYA)XIII <u>rpsL</u> (Sm ^r). Lisógena de Muc ^r	Casadaban, 1975
H8101	F- <u>pro leu thi lacY rpsL20 hsdR hsdM</u> <u>ara14 galK2 xy15</u> <u>mtlI supE44 endoI- recA-</u> Sm ^r .	Maniatis, 1982
<u>R. phaseoli</u>		
CE3	Derivada Sm ^r de la cepa silvestre CFN42. Nod ^r Fix ^r	Noel et al., 1984
CFN2001	Derivada Rif ^r de la cepa silvestre CFN42. Curada de los plásmidos p42a y p42d. Nod ^r Fix ^r .	Palacios et al., 1983
PLASMIDOS Y BACTERIOFAGOS		
pSM991.25	Derivado del pSM991. Icr ^r . Nod ^r Fix ^r .	Cavallos et al., en prep.
MudIIIPR13	Derivado de MudIIIPR3 donde <u>ppI</u> se sustituyó por el operón <u>lac</u> sin promotor. Cm ^r .	Ratet et al., 1986.
pRK2013	Derivado de RP4. Con origen de replicación de ColE1. Kan ^r .	Ditta et al., 1980.
pNC206	Derivado de RP4. Plásmido IncP1, Kan ^r , Apr ^r , Cb ^r .	A. Puhler.
pMV1 y 2	pSM991.25::MudIIIPR13::pNC206. Inserciones en el fragmento de 8.2 kb <u>EcoRI</u> (vehículo) del pSM991.25. Cm ^r , Icr ^r , Kan ^r .	Este trabajo
pMV3-8	pSM991.25::MudIIIPR13::pNC206. Inserciones en el fragmento de 5.5 kb <u>EcoRI</u> (<u>nodD</u>) del pSM991.25. Cm ^r , Icr ^r , Kan ^r .	Este trabajo
pMV9	pSM991.25::MudIIIPR13::pNC206. Inserciones en el fragmento de 0.6 kb <u>EcoRI</u> del pSM991.25. Cm ^r , Icr ^r , Kan ^r .	Este trabajo
pMV10-17	pSM991.25::MudIIIPR13::pNC206. Inserciones en el fragmento de 6.9 kb <u>EcoRI</u> (<u>nodABC</u>) del pSM991.25. Cm ^r , Icr ^r , Kan ^r .	Este trabajo
pMV18 y 19	pSM991.25::MudIIIPR13::pNC206. Inserciones en el fragmento de 2.0 kb <u>EcoRI</u> del pSM991.25. Cm ^r , Icr ^r , Kan ^r .	Este trabajo
pMV20-26	pSM991.25::MudIIIPR13::pNC206. Inserciones en el fragmento de 3.5 kb <u>EcoRI</u> (<u>hsc</u>) del pSM991.25. Cm ^r , Icr ^r , Kan ^r .	Este trabajo

TABLA 2

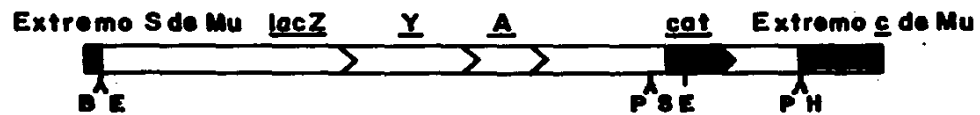


FIG. 3 Mud II PR13 8.9Kb ——— 1Kb

RESULTADOS

Construcción de cepas

La mutagénesis al azar del cósmido pSM991.25 se llevó a cabo en Escherichia coli por la facilidad en la manipulación y para ello fué necesario construir algunas cepas.

Inicialmente introdujimos el pSM991.25 a la cepa MC4100 Mucts/MudIIPR13 con el fin de que al termoinducir el bacteriófago transpusiera azarosamente al cósmido pSM991.25.

La introducción del cósmido a la cepa MC4100 Mucts/MudIIPR13, se llevó a cabo por conjugación en una cruce triparental que incluyó a la cepa HB101/pSM991.25 como donadora y a la MC4100 Mucts/MudIIPR13 como receptora. Además utilizamos la cepa HB101/pRK2013. El plásmido pRK2013 es utilizado como "ayudador" para complementar las funciones de transferencia ausentes en el cósmido pSM991.25.

Después de realizar la cruce, se seleccionaron las colonias que contenían al bacteriófago MudIIPR13 y al cósmido pSM991.25 por las resistencias a cloranfenicol y a tetraciclina que conferían respectivamente.

Posteriormente, se probó la termosensibilidad de varias de las colonias Cm^r Tc^r a través de crecimientos en parche a 30° y a 42°C.

Una vez obtenida la cepa MC4100 Mucts MudIIPR13/pSM991.25,

se llevó a cabo la termoinducción del bacteriófago como se indica en materiales y métodos.

Hasta el momento la única forma de introducir DNA extracromosomal a Rhizobium con buena eficiencia es a través de la conjugación. El objetivo final de la estrategia de la construcción de las mutantes, era tener los cósmidos con las distintas inserciones en cepas de Rhizobium para poder probar su fenotipo simbiótico. Sabíamos que los cósmidos se tendrían que introducir a Rhizobium por conjugación. Sin embargo estos cósmidos poseen un origen de replicación derivado del plásmido Cole1 que no es funcional en las Rizobiáceas. El plásmido pNC206 contiene un origen de replicación derivado de RP4 que si es funcional en Rhizobium phaseoli y por esta razón se introdujo por transformación a la cepa M8820 Mu, seleccionando colonias Km^r. Esta cepa es utilizada en el protocolo de la termoinducción del bacteriófago como la receptora del DNA a donde transpuso el bacteriófago. Al poseer también el plásmido pNC206 ya sólo era necesario llevar a cabo cruza biparentales de la cepa M8820 Mu/pNC206 con las distintas inserciones como donadora y las cepas de Rhizobium a donde se quisieran introducir las mutaciones como receptoras.

Sin embargo, al hacer la transducción del DNA con el bacteriófago, durante la fase de recuperación (ver materiales y métodos), se observó lisis de los cultivos, aún en el cultivo control al que no se había añadido el lisado. El experimento se

repetió 3 veces y el fenómeno de lisis fué reproducible. Por esta razón se utilizó la cepa M8820 Mu sin el plásmido pNC206 como receptora de la transducción.

De esta forma se obtuvieron aproximadamente 10 colonias por cada 10⁶ bacteriófagos cuando la multiplicidad de infección fué de 10. Se parcharon 500 colonias en medios selectivos para cloranfenicol y tetraciclina por separado y el 99% de estas colonias fue Cm^r Tc^r, lo cual quiere decir que el 99% de las inserciones se encontraban el cósmido pSM991.25.

250 de estas colonias se conjugaron por el método de réplica con la cepa HB101/pNC206 y se seleccionaron las colonias que fueran Cm^r Tc^r Km^r. Por el mismo método los cointegrados del pSM991.25::MudIIPR13::pNC206 (pMV1-250) se transfirieron a la cepa de Rhizobium phaseoli CFN2001 y se seleccionaron las colonias que fueron Cm^r Tc^r Km^r Rif^r.

Un resumen de la estrategia genética para la construcción de las mutantes y su transferencia a R. phaseoli se encuentra en la Tabla 3.

Mapeo de las Inserciones

Para hacer el mapeo de las inserciones se purificaron 45 cósmidos con las diversas inserciones a partir de la cepa M8820 Mu. Sabíamos que el pSM991.25 media entre 20 y 25 Kb. Al decidir

mapear 45 inserciones distintas, pensamos que seria suficiente para tener cuando menos una inserción por kilobase en cada una de las dos orientaciones posibles.

Los cósmidos se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI en digestiones sencillas y dobles. Se eligieron estas enzimas pues los sitios de corte de las mismas en el bacteriófago son asimétricos (ver Fig. 3) y en el caso de BamHI el sitio de corte es sólo uno. Todo esto facilitó el mapeo y la determinación de la orientación en la que el bacteriófago se insertó en cada caso. De esta forma se caracterizaron 45 cósmidos. Las fotografías de los geles con las diversas digestiones se encuentran en la figura 4.

El mapa del cósmido con las 45 inserciones mapeadas se encuentra en la figura 5 y la orientación de las mismas en la figura 6.

Fenotipo Simbiótico de las Mutantes

Las 45 mutantes se inocularon en plantas de Phaseolus vulgaris L. Cv. Negro Jamapa por separado, como se indica en materiales y métodos. Después de repetir el experimento cuatro veces se pudieron describir los siguientes fenotipos que se encuentran en la figura 7:

1. Nod⁺ donde todas las plantas en todos los experimentos realizados presentaron nódulos al mismo tiempo, color, tamaño y

cantidad que las plantas inoculadas con la cepa CFN2001/pSM991.25.

2. Nod⁻ donde las plantas en los experimentos realizados no presentaron ni un sólo nódulo al igual que las plantas inoculadas con la cepa CFN2001.

3. Nod^{+/-}

a. Este fenotipo está definido por una eficiencia de nodulación menor que la de la cepa CFN2001/pSM991.25, aunque los nódulos existentes son similares a los provocados por el cósmido pSM991.25, a excepción de los nódulos del cósmido pMV16.1 que son nódulos pequeñísimos y blancos.

b. El fenotipo Nod^{+/-}b. se definió para aquellas cepas que al ser inoculadas en plantas por duplicado en un mismo experimento, no causaron el mismo fenotipo simbiótico en las dos plantas inoculadas. Es decir que mientras una planta presentó un fenotipo Nod⁺, la otra fué Nod⁻ y esto fué reproducible cada vez que se repitió el experimento.

4. Nod[?] se definió a todas aquellas cepas que a pesar de presentar el mismo fenotipo simbiótico en los duplicados de un mismo experimento, el fenotipo no fué el mismo entre experimento y experimento.

Para probar que la cepa inoculada en cada planta era la responsable de la aparición de los nódulos si era el caso, se purificaron bacterias de tres nódulos de cada planta y 10 colonias aisladas de cada uno de ellos se picaron en medios

selectivos para resistencia a cloranfenicol y tetraciclina. El 100% de las colonias picadas de todos los nódulos fueron Cm^r Tc^r, asegurando la presencia del pSM991.25 y del bacteriófago MudiIPR13. Con estos datos se puede decir que las inserciones en el pSM991.25 son perfectamente estables en la cepa CFN2001.

Localización de las Inserciones en los Genes nodABCD y hsn de Rhizobium phaseoli

Con el mapeo de las inserciones por enzimas de restricción sabíamos en qué fragmentos EcoRI del pSM991.25 se encontraba insertado el bacteriófago. También sabíamos qué fragmentos del pSM991.25 hibridizaban con los detectores de los genes nodABCD de R. meliloti (Cevallos et al., en preparación). El fragmento EcoRI de 6.8 Kb hibridiza con el detector de los genes nodABC de R. meliloti y el fragmento de 5.5 kb hibridiza con un detector del gene nodD también de R. meliloti.

Para localizar con más exactitud el sitio de las inserciones en los cósmidos se purificaron probadores específicos para los genes nodABC y D a partir del plásmido pKSK5 (Kondorosi et al., 1984) que contiene estos genes de R. meliloti (fig. 8). Los probadores fueron los siguientes:

1. Un fragmento BglII de 2.2 Kb que contiene el gene nodD completo.
2. Un fragmento SacII-PvuII de 0.8 Kb que contiene nodA casi com-

pleto y el inicio de nodB.

3. Un fragmento SacII de 1.95 Kb que contiene nodB incompleto y nodC completo.

4. Un fragmento HindIII de 0.5 kb intragénico de nodC.

Los cósmidos se purificaron de la cepa M8820 Mu y se hicieron dobles digestiones con las enzimas EcoRI y BamHI. Los resultados de estas hibridizaciones se encuentran en las figuras 9A, B y C y de esta forma se localizaron los fragmentos EcoRI-BamHI del pSM991.25 que contienen los genes nodABC y D de R. phaseoli. El probador para nodD presentó señal de hibridización con las bandas de EcoRI-BamHI de 2.45 y 3.1 kb que constituyen el fragmento de 5.5 kb de EcoRI; el probador nodAB hibridizó con la banda de 4.2 kb de BamHI del fragmento de 6.8 kb de EcoRI. Con este probador también se obtuvo una señal en una banda de 3.1 kb que podría estar localizada en la zona de nodD ó en la banda de 3.5 kb de EcoRI (hsn). El probador nodBC, al igual que el de nodC, hibridizaron con una banda de BamHI de 1.2 kb dentro del fragmento de 6.8 kb de EcoRI. Estos datos se encuentran en la figura 5.

Finalmente era necesario comprobar que los mismos cósmidos que se tenían en la cepa de E. coli M8820 Mu fueron los que se transfirieron a la cepa de R. phaseoli CFN2001 y que las mismas inserciones mapeadas en E. coli eran las responsables del fenotipo simbiótico alterado que se había detectado en los experimentos de nodulación. Con este motivo, se hicieron

hibridizaciones con DNAs totales de la cepa CFN2001 con los distintos cósmidos.

Para los DNAs que contenían inserciones en los fragmentos de 5.5 y 3.5 Kb de EcoRI que contienen nodD y el o los genes hsn respectivamente, se utilizó como probador el pSM991.25 completo.

Para las inserciones en el fragmento de 6.8 Kb que contiene a los genes nodABC, se utilizó como probador este mismo fragmento purificado del pSM991.25. La razón por la cual para este caso no se utilizó el cósmido completo es que el cósmido, en el vehículo, contiene el gene cat (Cm^R) que se inactivó en uno de los pasos de la clonación (Cevallos et al., en preparación). Esta secuencia hubiera hibridizado con una banda de 6.8 Kb del bacteriófago MudIIPR13 que contiene el gene cat y esto hubiera enmascarado la detección de la inserción en el fragmento de 6.8 Kb en el cósmido pSM991.25. Los resultados de estas hibridizaciones se encuentran en la figura 10A, B y C. En la mayoría de los casos, se encontró que las inserciones mapeadas en el fondo genético de E. coli, fueron transferidas idénticas a la cepa CFN2001.

HB101/PSM991.25 (Tc^R) X MC4100/MUD11PR13 (Cm^R) → MC4100/MUD11PR13/PSM991.25 (Cm^R Tc^R)



TERMOINDUCCIÓN DE LA CEPA MC4100/MUD11PR13/PSM991.25



INFECCIÓN DE LA CEPA M8820 MU CON UN LISADO DE LA MC4100/MUD11PR13/PSM991.25



SELECCIÓN DE COLONIAS Cm^R Tc^R (M8820 MU/PSM991.25::MUD11PR13)

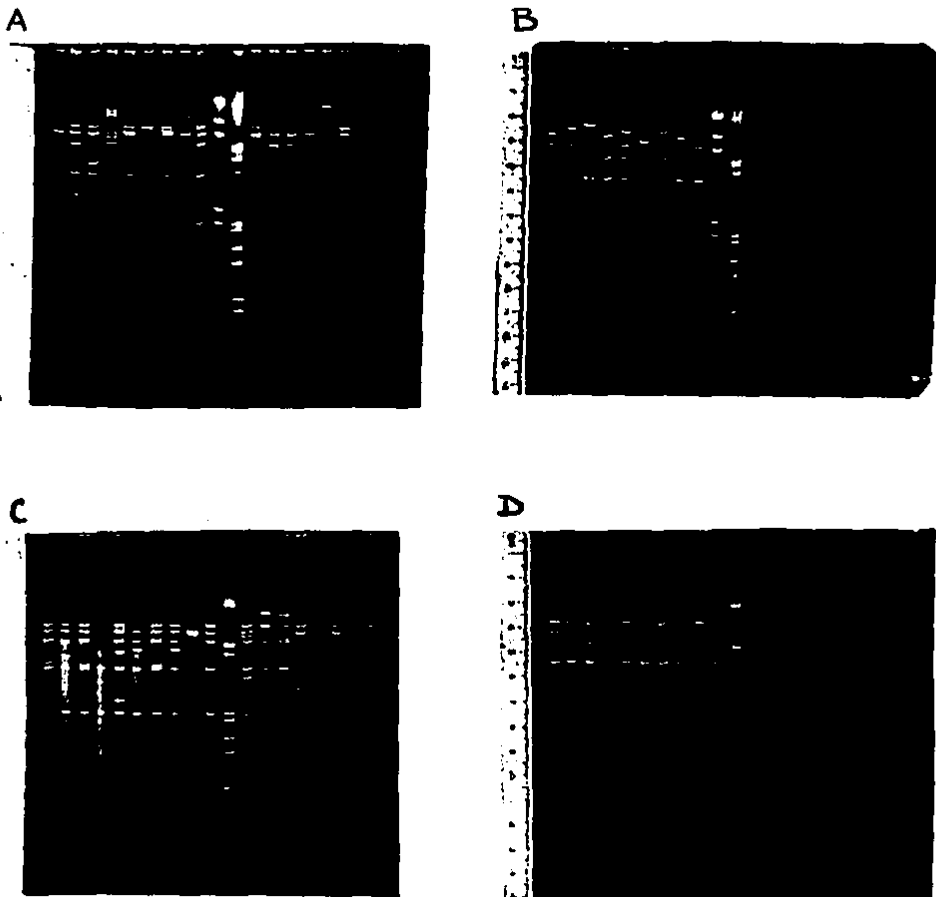


HB101/PNC206 (KAN^R) X M8820 MU/PSM991.25::MUD11PR13 (Cm^R Tc^R) →
M8820 MU/PSM991.25::MUD11PR13::PNC206 (PMV1-250) (Cm^R Tc^R KAN^R)



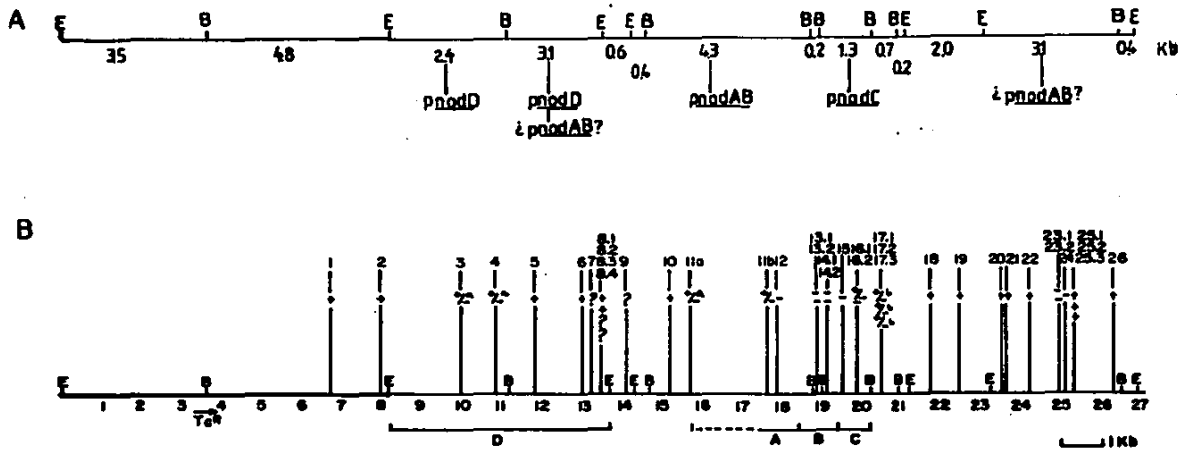
M8820/PMV1-250 (Cm^R Tc^R KAN^R) X CFN2001 (RIF^R) → CFN2001/PMV1-250 (Cm^R Tc^R KAN^R RIF^R)

TABLA 3



LOS GELES FUERON CORRIDOS COMO SE INDICA EN MATERIALES Y MÉTODOS. LOS CÓSMIDOS SE PURIFICARON DE LA CEPA M8820 MU Y SE DIGIRIERON EN LOS GELES A Y C CON *EcoRI* Y EN LOS GELES B Y D CON *BamHI*, PARA LOS GELES A Y B EL ORDEN ES EL SIGUIENTE: 1, pMV8.1; 2, -; 3, pMV3; 4, pMV17.3; 5, pMV6; 6, -; 7, pMV7; 8, pMV4; 9, pSM99.25; 10, .. *HindIII* 11, λ *HindIII EcoRI*; 12, pMV25.2; 13, pMV26; 14, pMV25.3; 15, pMV8.2; 16, pMV5; 17, pMV8.4; 18, pMV25.1; 19, -; 20, -. PARA LOS GELES D Y C EL ORDEN ES EL SIGUIENTE: 1, pMV12; 2, pMV15; 3, pMV16.1; 4, """" pMV14.1; 5, -; b, pMV15.1; 7, pMV16.2; 8, pMV13.2; 9, -; 10, pSM991.25; 11, λ *HindIII EcoRI*; 12, pMV17.2; 13, pMV10; 14, pMV11; 15, pMV22; 16, pMV17.1; 17, pMV8.3; 18, -; 19, pMV14.2; 20, -.

FIG. 4. GELES DE DIGESTIONES *EcoRI* Y *BamHI* DE CUSMIDOS CON DIFERENTES INSERCIONES



EN LA FIGURA SE REPRESENTA AL PSM991.25. EN LA SECCIÓN A SE INDICA EL TAMAÑO DE LAS BANDAS EN LAS DIGESTIONES DOBLES *EcoRI*-*BamHI* Y LAS BANDAS QUE POR SU TAMAÑO PODRÍAN SER LAS QUE SE OBSERVAN EN LAS HIBRIDIZACIONES HETERÓLOGAS CON LOS DIFERENTES PROBADORES.

EN LA SECCIÓN B LAS RAYAS VERTICALES REPRESENTAN LAS INSERCIÓNES AISLADAS. EL NÚMERO SOBRE LAS RAYAS VERTICALES ES EL NÚMERO DE LA INSERCIÓN.

LOS ENSAYOS DE NODULACIÓN SE LLEVARON A CABO COMO SE INDICA EN MATERIALES Y MÉTODOS. LOS FENOTIPOS SIMBIÓTICOS DE CADA UNA DE LAS INSERCIÓNES ESTÁN REPRESENTADOS COMO +, +/-, - Y ? Y SIGNIFICAN: +, MODULACIÓN NORMAL; +/-A, EFICIENCIA DE MODULACIÓN MENOR A LA CAUSADA POR EL PSM991.25 EN LA CEPA CE3 PSM⁻ (CFN2001); +/-B, FENOTIPO SIMBIÓTICO *Nod*⁺ EN UNA PLANTA Y *Nod*⁻ EN EL DUPLICADO EN EL MISMO EXPERIMENTO; -, NO NODULÓ; ?, PLANTAS QUE NO PRESENTARON EL MISMO FENOTIPO SIMBIÓTICO ENTRE EXPERIMENTO Y EXPERIMENTO.

SE INDICAN TAMBIÉN LAS BANDAS QUE HIBRIDIZAN CON EL PROBADOR DE *nodD* COMO D Y LA ZONA DONDE SE LOCALIZAN *nodABC* COMO ABC. LA RAYA PUNTEADA INDICA LA AMBIGÜEDAD DE LA LOCALIZACIÓN DEL INICIO DE *nodA* DEBIDO A LAS DOS POSIBILIDADES DE ORIENTACIÓN DE LA INSERCIÓN 11 (11a Y 11b). E ES *EcoRI* Y B ES *BamHI*

FIG. 5. MAPEO DE LAS INSERCIÓNES PstI-26 EN EL PSM991.25

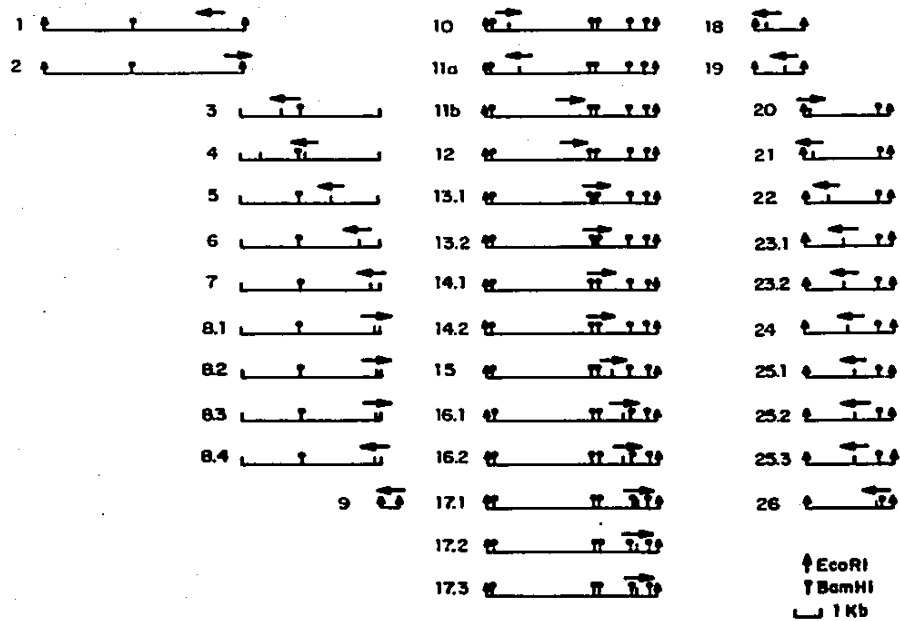
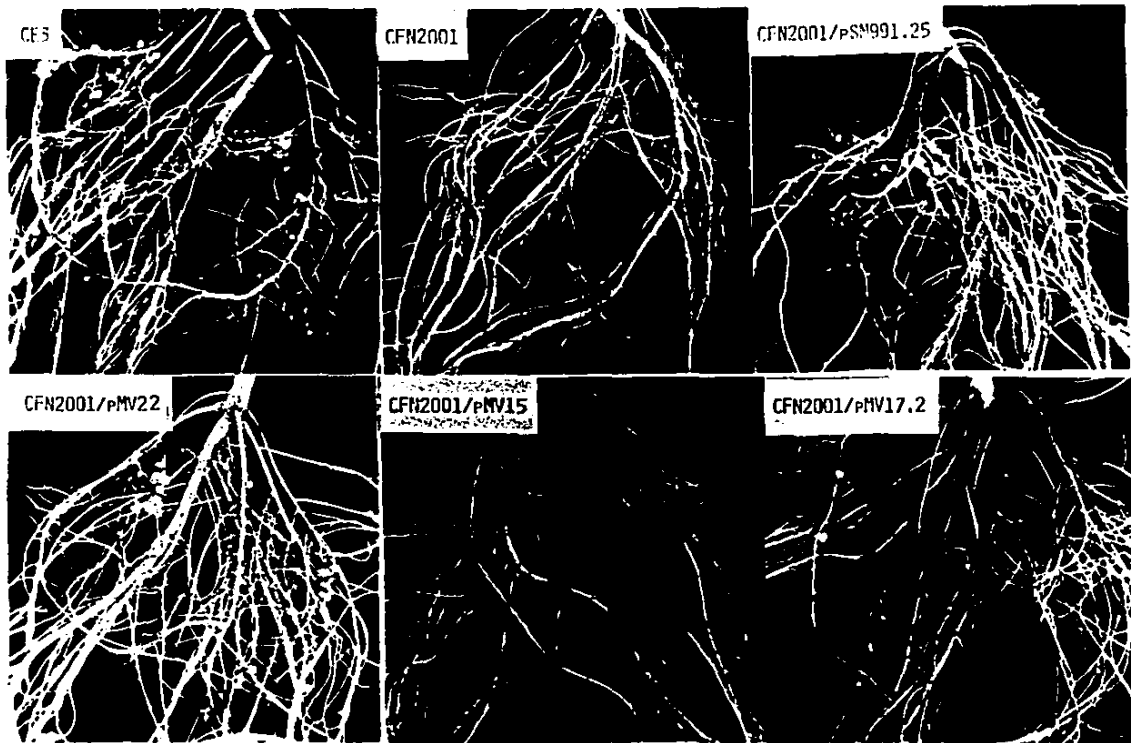


FIG 6 ORIENTACION DE LAS INSERCIONES pMV1-26



LOS ENSAYOS DEL FENOTIPO SIMBIOTICO EN PLANTA SE LLEVARON A CABO COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS. 1. CE3, CEPA SILVESTRE, Nod⁺Fix⁺; 2. CFN2001 (CE3 pSim⁻), Nod⁻; 3. CFN2001/pSM991.25, Nod⁺, Fix⁻; 4. CFN2001/pMV22, Nod⁺, Fix⁻; 5. CFN2001/pMV15, Nod⁻; 6. CFN2001/pMV17.2, Nod⁺, Fix⁻.

FIG. 7. FENOTIPUS NOD DE DIFERENTES MUTANTES EN *PHASEOLUS VULGARIS*.

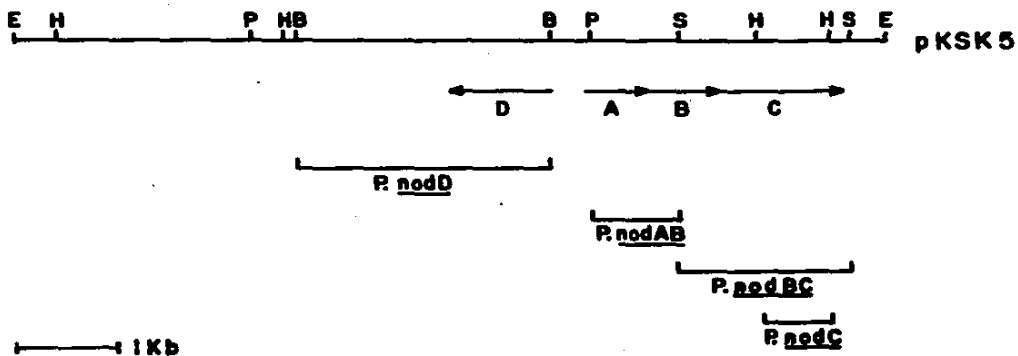
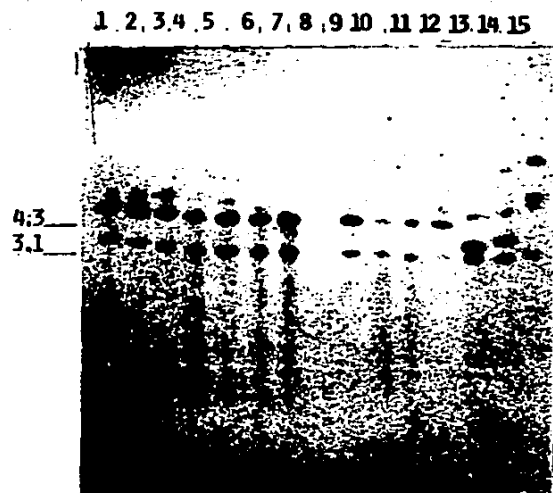
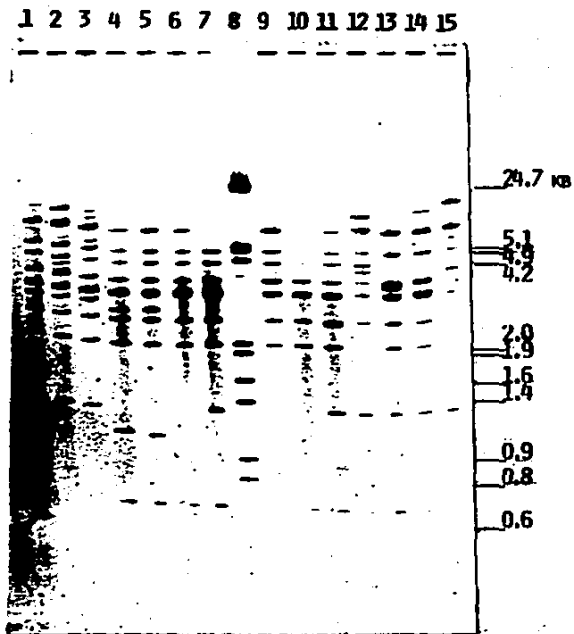
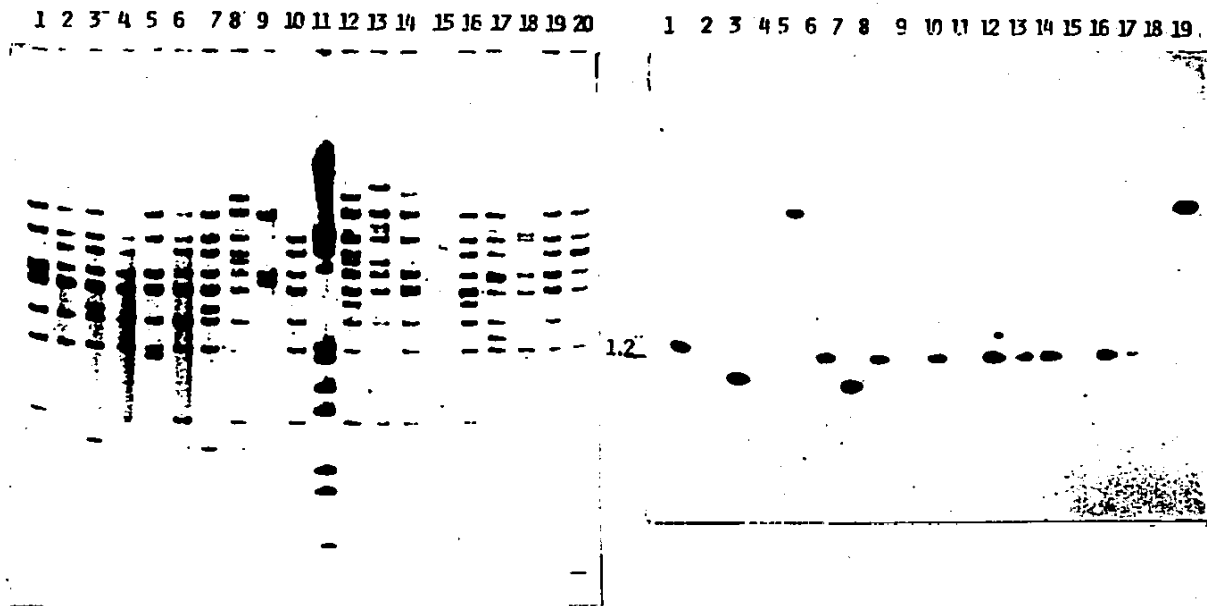


FIG. 8 PROBADORES DE *R. meliloti* UTILIZADOS



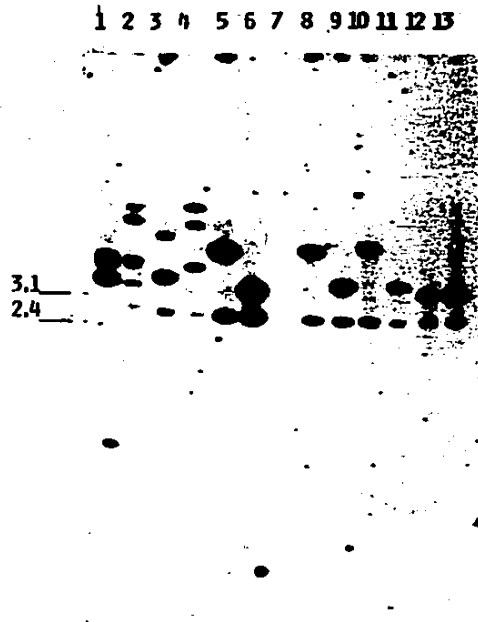
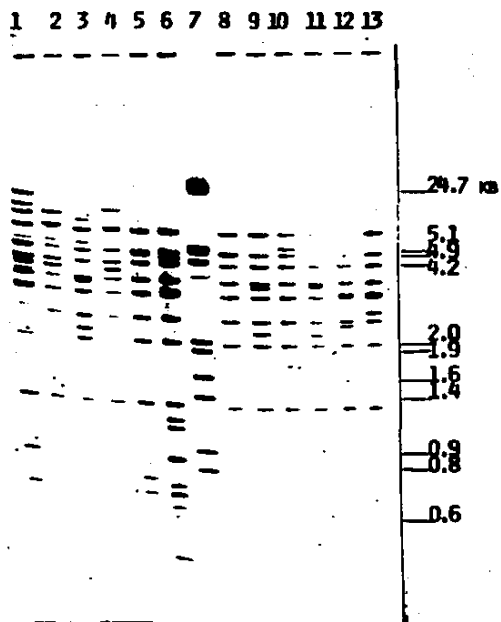
LOS DNAs DE LOS CÓSVIDOS FUERON PURIFICADOS DE LA CEPA M8820 MU Y SE DIGIRIERON CON *EcoRI* Y *BamHI*. LA ELECTROFORESIS SE LLEVO A CABO COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y MÉTODOS. SE HIBRIDIZO CON UN PROBADOR MARCADO CON ^{32}P *nodAB* DE *B. MELILOTI* (FIG. 8). ORDEN: 1, PHV17.1; 2, PHV17.2; 3, PHV17.3; 4, PHV16.1; 5, PHV16.2; 6, PHV15; 7, PSH991.25; 8, λ *HINDIII EcoRI*; 9, PHV14.2; 10, PHV14.1; 11, PHV13.1; 12, PHV13.2; 13, PHV12; 14, PHV291; 15, PHV10.

FIG. 9A. HIBRIDIZACION CONTRA *nodAB* DE *B. MELILOTI*.



LOS DNAs DE LOS CÓSMIDOS FUERON PURIFICADOS DE LA CEPA M8820 MU Y SE DIGIRIERON CON ECORI Y BANI. LA ELECTROFORESIS SE LLEVO A CABO COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y MÉTODOS. SE HIBRIDIZÓ CON UN PROBADOR MARCADO CON ³²P DE NDG DE B. MELLLOTI (FIG. 8). ORDEN: 1, PHV12; 2, PHV15; 3, PHV16.1; 4, PHV14.1; 5, DELECIÓN; 6, PHV13.1; 7, PHV16.2; 8, PHV13.2; 9, DELECIÓN; 10, PSM991.25; 11, Δ MIND111 ECORI; 12, PHV17.2; 13, PHV10; 14, PHV11; 15, PHV22; 16, PHV17.1; 17, PHV8.3; 18, Δ 19, PHV14.2; 20, DELECIÓN.

FIG. 9B. HIBRIDIZACION CONTRA NDG DE B. MELLLOTI

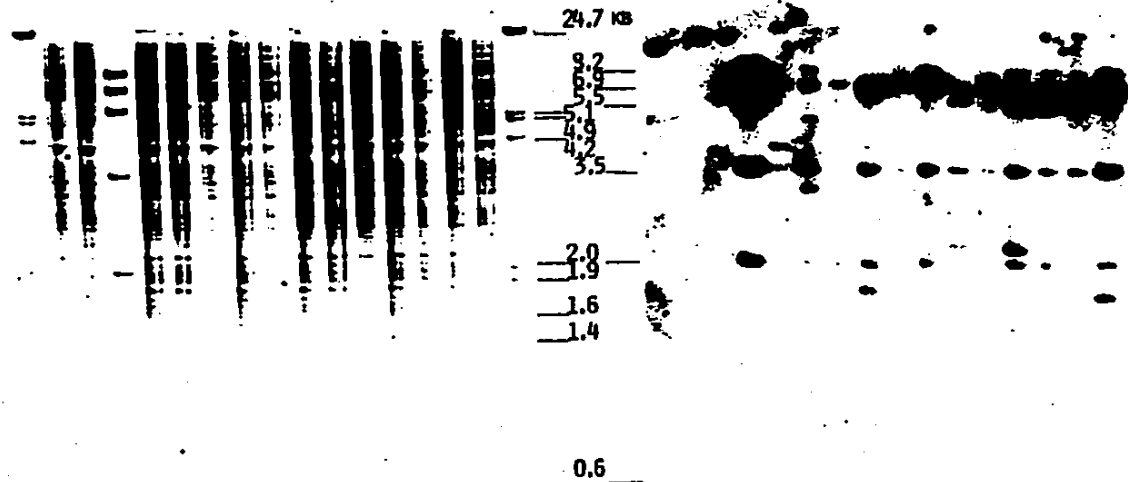


LOS DNAs DE LOS COSMIDOS FUERON PURIFICADOS DE LA CEPA H8820 MU Y SE DIGIRIERON CON *ECOR*I Y *BA*HI. LA ELECTROFORESIS SE LLEVÓ A CABO COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y MÉTODOS. SE HIBRIDIZÓ CON UN PROBADOR MARCADO CON 32 P DE *MODD* DE *B. HELLLOT*. ORDEN: 1. PHV3; 2. PHV4; 3. PHV8.3; 4. PHV5; 5. PHV6; 6. PSM991; 7. Δ *HIND*III *ECOR*I; 8. PHV7; 9. PHV8.1; 10; PHV8.4; 11. PHV8.2; 12. -; 13. PHV9.

FIG. 9C. HIBRIDIZACION CONTRA *MODD* DE *B. HELLLOT*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

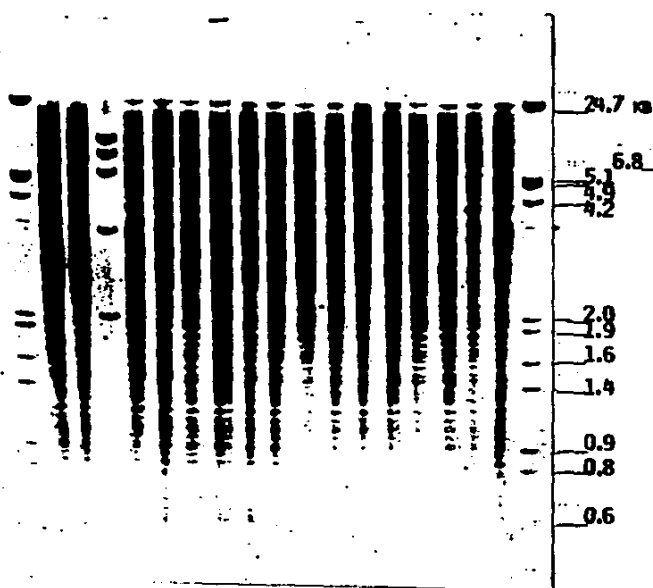
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



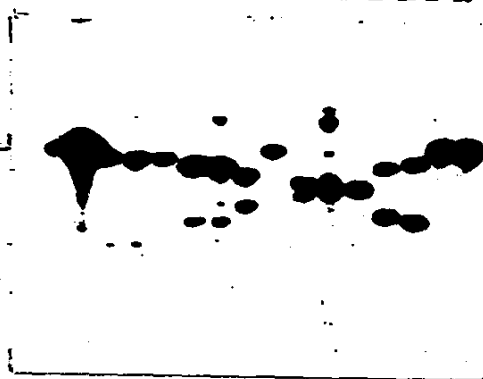
SE PURIFICARON DNAs TOTALES DE LA CEPA CFN2001 CON LOS CÓSVIDOS CON INSERCIÓNES EN EL FRAGMENTO DE 5.5 KB *ECOR*I DEL PSM991.25 Y SE DIGIRIERON CON *ECOR*I. LA ELECTROFORESIS SE LLEVÓ A CABO COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y MÉTODOS. SE HIBRIDIZÓ CONTRA EL PSM991.25 MARCADO CON ³²P. ORDEN: 1, Δ *HIND*III *ECOR*I; 2. CFN2001; 3. CE3; 4. PSM991.25; 5. PHV3; 6. PHV4; 7. PHV8.3; 8. PHV5; 9. PHV6; 10. PHV7; 11. PHV8.1; 12. PHV8.4; 13. PHV8.2; 14. -; 15. PHV9; 16. -; 17. Δ *HIND*III *ECOR*I.

FIG. 10A. HIBRIDIZACION CONTRA PSM991.25 DE LAS INSERCIÓNES EN EL FRAGMENTO DE 5.5 KB DE *ECOR*I EN LA CEPA CFN2001

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

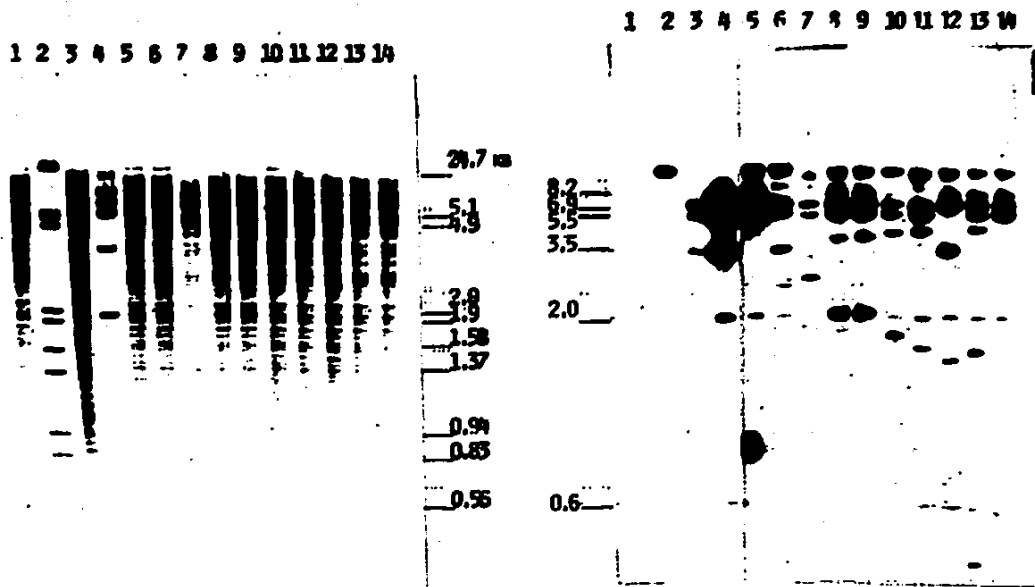


2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



SE PURIFICARON DNAs TOTALES DE LA CEPA CFN2001 CON LOS COSMIDOS CON INSERCCIONES EN EL FRAGMENTO DE 6.8 KB *EcoRI* DEL PSH991.25 Y SE DIGIRIERON CON *EcoRI*. LA ELECTROFESIS SE LLEVO A CABO COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS. SE HIBRIDIZO CONTRA EL FRAGMENTO DE 6.8 KB *EcoRI* DEL PSH991 MARCADO CON ^{32}P . ORDEN: 1. λ *HindIII EcoRI*; 2. CFN2001; 3. CE3; 4. PSH991.25; 5. PHV17.1; 6. PHV17.2; 7. PHV17.3; 8. PHV16.1; 9. PHV16.2; 10. PHV15; 11. PHV14.2; 12. PHV14.1; 13. PHV13.1; 14. PHV13.2; 15. PHV12; 16. PHV11; 17. PHV10; 18. -; 19. λ *HindIII EcoRI*.

FIG. 10B. HIBRIDIZACION CONTRA *NODABC* DE *B. PHLAEOI* DE LAS INSERCCIONES EN EL FRAGMENTO DE 6.8 KB *EcoRI* EN LA CEPA CFN2001.



SE PURIFICARON DNAs TOTALES DE LA CEPA CFN2001 CON LOS CÔSMIDOS CON INSERCIÓNES EN EL FRAGMENTO DE 6.8 KB *EcoRI* DEL PSH991.25 Y SE DIGIRIERON CON *EcoRI*. LA ELECTROFÓRESIS SE LLEVO A CABO COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y MÉTODOS. SE HIBRIDIZÓ CON EL PSH991.25 MARCADO CON ^{32}P . ORDEN: 1, CFN2001; 2, Δ HLND111 *EcoRI*; 3, PSH991.25; 4, CE3; 5, PHV20; 6, PHV21; 7, PHV22; 8, PHV23.1; 9, PHV23.2; 10, PHV24; 11, PHV25.1; 12, PHV25.2; 13, PHV25.3; 14, PHV19

FIG. 10C. HIBRIDIZACION CONTRA EL PSH991.25 DE LAS INSERCIÓNES EN EL FRAGMENTO DE 3.5 KB *EcoRI* (MEM) EN LA CEPA CFN2001.

DISCUSION

En el presente trabajo, se utilizó el cósmido pSM991.25 que como se mencionó en Antecedentes y Objetivos sabíamos que contenía un fragmento de 18.5 kb del pSym de la cepa de R. phaseoli CE3. Teníamos evidencias para afirmar que el pSM991.25 llevaba los genes nodABC funcionales, una región con la información necesaria para capacitar a R. meliloti para nodular frijol (gen o genes hcn) y una secuencia que hibridizaba con un probador para el gene nodD de R. meliloti.

Este cósmido fué mutagenizado al azar con el bacteriófago MudIIPR13 (fig. 3) con el objetivo de localizar finamente las zonas esenciales para la formación y desarrollo del nódulo. Las zonas esenciales se localizaron al observar el fenotipo simbiótico causado por las diferentes inserciones cuando se hicieron ensayos de nodulación en Phaseolus vulgaris. De esta forma, encontramos dos regiones que al ser mutagenizadas generaban fenotipos Nod⁻: la primera de estas zonas fué la que contenía los genes nodABC. El mapeo de restricción y la hibridización DNA-DNA con probadores específicos para estos tres genes (figs. 5 y 9), indicaron que los cósmidos pMV10, 11 y 12 contenían inserciones en una banda de BamHI de 4.3 kb que hibridiza con el probador de nodAB de R. meliloti. Ya que el pMV10 ocasiona un fenotipo simbiótico Nod⁺, el pMV11 presenta un fenotipo Nod^{+/}-a y el pMV12 es Nod⁻, proponemos que el gene nodA

se localiza entre los sitios de inserción en los cósmidos pMV11 y 12. Dado que el sitio de la inserción del pMV11 es ambigua y que no se encontraron inserciones que mapearan en esta región del cósmido, no se puede situar con exactitud la localización de nodA. Sin embargo, se están buscando más inserciones que se encuentren en el fragmento de BamHI de 4.3 kb para delimitar aún más la región donde se encuentran los genes nodABC.

La localización del gene nodB que sugerimos a partir de los datos obtenidos es entre nodA y nodC, ya que en las hibridaciones con los probadores para nodC y para nodBC (fig. 9B), la banda que hibridiza es la de 1.2 kb en BamHI y que con el probador para los genes nodAB hibridiza el fragmento de BamHI de 4.3 kb (fig. 9A). El gene nodB debe tener por lo menos un sitio de restricción interno para BamHI muy cercano al sitio de SacII utilizado para obtener los probadores nodAB y nodBC para poder explicar que ambos probadores hibridicen con bandas distintas. Esta suposición se apoya por el hecho de que se predicen dos sitios de BamHI que generan una banda muy pequeña de aproximadamente 0.2 kb con las inserciones en el pMV13.1 y 13.2 (fenotipo Nod⁻) entre las bandas de 1.2 y 4.3 kb de BamHI.

Las otras opciones serían que nodB no se encuentre en esta región y que mapee en alguna otra zona del cósmido, lo cual sería diferente a lo encontrado para otros Rhizobia (fig. 1), como por ejemplo en el fragmento de EcoRI-BamHI de 3.1 kb localizado en lo que nosotros postulamos sea el fragmento del gene hns ó en la

banda EcoRI-BamHI de 3.1 kb de la zona donde se localiza nodD, ya que el patrón de la hibridización con el probador nodAB, además de la banda de BamHI de 4.3 kb localizada dentro del fragmento de EcoRI de 6.9 kb que contiene a los genes nod, presenta también una banda de hibridización de similar intensidad de 3.1 kb, que según el mapa construido es imposible que esté dentro de este fragmento de 6.9 kb de EcoRI.

Sin embargo esta banda de 3.1 kb de hibridización con el probador nodAB podría tener otras explicaciones: a) dado que el probador nodAB contiene la región 5' de control del gene nodA, y que se ha descrito que el operón nodABC lleva en esta zona una caja nod involucrada en la activación de este operón y de otros genes nod como nodFE, nodH y nodM (Rossen et al., 1987), es posible que el probador nodAB esté hibridizando con el fragmento EcoRI-BamHI de 3.1 kb del gene hslA a pesar de que la caja nod consenso sea de sólo 25 pares de bases (Martínez et al., aceptado). Rostas et al., 1986, han encontrado una secuencia conservada de 47 pb en las regiones 5' de tres unidades transcripcionales nod (nodABC, nodEFG y nodH) en R. meliloti y Spaink et al., 1987, han propuesto una secuencia consenso de 70 pb aproximadamente a partir de la comparación de tres promotores inducibles por exudados vegetales (pr.nodA, pr.nodE y pr.nodM) en R. leguminosarum. Por otro lado, Cevallos et al., enviado) al hibridizar el probador nodAB con el pSM991.25 digerido con EcoRI, observa claramente la banda de 6.9 kb (genes nod) y una banda más

tenue de 3.5 kb (gen hsn).

b) La otra posibilidad para explicar la aparición de la banda de 3.1 kb con el probador nodAB es que alguno de estos dos genes o ambos se encontraran reiterados, aunque fuera parcialmente en esta banda. Sin embargo, la hibridización con probadores nodABC completos contra el genoma total de la cepa de R. phaseoli CE3 presentan una sola banda de hibridización en un fragmento de 6.9 kb de EcoRI (Cevallos et al., enviado).

Para solucionar este problema, no cabe duda de que lo más importante sería hacer estas hibridizaciones con probadores exclusivos de nodA, nodB y de la región 5' de nodA.

Los cósmidos pMV14.1 y 15 poseen inserciones en el gene nodC y ocasionan un fenotipo Nod⁻ absoluto, similar al encontrado con inserciones en este gene en otros rhizobia, donde las mutantes en nod A, B ó C no provocan el enroscamiento del pelo radicular (fenotipo Hac⁻) (Djordjevic et al., 1987a). Se ha encontrado que los genes nodABC por si solos pueden inducir meristemas nodulares aunque no se ha observado la formación de hilos de infección (Hirsch et al., 1985). Los cósmidos pMV16.1 y 2 también poseían inserciones en el gene nodC, aunque al probar una de estas cepas (pMV16.1) en un ensayo de nodulación en maceta donde el proceso es más favorecido que el ensayo en matraz, se encontró que la cepa que contenía esta inserción era capaz de hacer nódulos blancos muy pequeños (A. de las Peñas, comunicación personal) y de los cuales fuimos incapaces de extraer bacterias, por lo que es

posible que los nódulos formados por esta cepa carezcan de células infectadas con bacteroides; es decir, que si este fuera el caso, existiría diferenciación celular del tejido vegetal para formar una estructura similar a un nódulo. Cuando se analizaron las proteínas solubles de los nódulos producidos por esta mutante en geles de una dimensión de poliacrilamida-SDS, se encontró que el patrón obtenido era mucho más parecido a las proteínas encontradas en un extracto soluble de raíz de frijol que al de nódulos bien diferenciados (J. Padilla, comunicación personal). Por esta razón, esta mutante sería ideal para estudiar las primeras nodulinas inducidas, necesarias para la iniciación del desarrollo del nódulo cuando la bacteria no ha alcanzado su destino final en las células infectadas de la planta. Por el momento se está llevando a cabo un estudio de microscopia de los nódulos producidos por la cepa que contiene el cósmido pMV16.1, para determinar la presencia o ausencia de bacterias ó bacteroides dentro de los mismos, así como el grado de diferenciación y desarrollo de estos nódulos.

En conclusión, la localización más probable de los genes nodABC de la cepa CE3 de R. phaseoli se encuentra representada en la fig. 1.

Las inserciones en el pMV17.1, 17.2 y 17.3 en el fragmento de BamHI de 0.7 kb, causaron un fenotipo $Nod^{-}b$. Este fragmento está situado al lado del fragmento de BamHI de 1.3 kb, que contiene a nodC. Sin embargo, al hacer las hibridizaciones contra el

probador de este gene, nodC no parece encontrarse en la banda de 0.7 kb (fig. 9B). Las inserciones 17.1, 17.2 y 17.3 podrian presentar este fenotipo si se encuentran en el extremo 3' del gene nodC.

La otra zona donde encontramos un fenotipo Nod⁻ fué en el fragmento EcoRI de 3.5 kb que sabemos que contenia uno o más genes importantes para capacitar a la bacteria para nodular frijol (h_{sn}). Los cósmidos pMV23.1, 23.2 y 24 contienen inserciones que causan un fenotipo Nod⁻ absoluto. Dado que estas tres inserciones mapean en una zona de 0.3 kb y que las inserciones más cercanas que las flanquean y que ya causan un fenotipo Nod⁺, están a menos de 1 kb, sugerimos que en esta región existe un sólo gene del tipo h_{sn} (fig. 5). Por el momento, nos interesaria saber si este gene es similar a algunos de los genes de especificidad (nod F, E, G ó H) descritos para otros Rhizobia, que como se mencionó con anterioridad, a pesar de ser genes que confieren especificidad de infección y que no pueden complementar fenotipos alterados de nodulación cuando se hacen sustituciones interespecificas, si guardan gran homologia en secuencia nucleotidica (nod F y E) (Djordjevic, 1987a). Sin embargo, las mutaciones en los genes nod F, E y G no causan un fenotipo Nod⁻ absoluto como el que observamos con las inserciones en los pMV23.1, 23.2 y 24, sino un retraso en la aparición de los nódulos (ver Introducción). El único gene de especificidad donde se han descrito mutaciones que provocan fenotipos Nod⁻ al impedir

el enroscamiento del pelo es el gene nodH en R. meliloti (Horvath et al., 1986), el cual no se ha encontrado en otros Rhizobia, aunque posiblemente exista en R. trifolii (Spaink et al., 1987).

Otra zona mutagenizada fué el fragmento de EcoRI de 5.5 kb que sabiamos que hibridizaba con un probador que contiene el gene nodD de R. meliloti (Cevallos et al., enviado). En esta zona, las inserciones causaron dos clases de fenotipos alterados: las inserciones pMV3 y 4 presentaron un fenotipo de baja eficiencia en la nodulación (fenotipo Nod⁺-a) similar al encontrado en inserciones en nodD en R. meliloti donde este gene se encuentra reiterado dos veces y las dos copias son necesarias para obtener una nodulación eficiente (Kondorosi et al., 1986). Sin embargo, si nodD se localizara en esta zona estaria alejado de los genes nodABC por 3.5 kb cuando en otros Rhizobia la distancia entre el inicio de nodD y el de nodA es de 0.5 kb. Dado que el ensayo de los fenotipos simbióticos fueron realizados en plantas crecidas en agar suave donde la nodulación no es tan eficiente como en otros sistemas, es necesario realizar los ensayos de eficiencia de nodulación en alguno de estos sistemas para corroborar el fenotipo Nod⁺- observado.

Las inserciones en los pMV5, 6 y 8.1 y 8.2 presentaron un fenotipo Nod⁺ y las inserciones 7, 8.3 y 8.4 presentaron un fenotipo Nod[?] al igual que la inserción del pMV9 situada en un fragmento EcoRI de 0.6 kb situado al lado del fragmento EcoRI de 5.5 kb.

El fenotipo Nod⁺ definido por el hecho de que en los ensayos simbióticos en frijol los fenotipos obtenidos no fueron reproducibles entre experimento y experimento, podría explicarse por una falla en los mismos, aunque al probar las resistencias a los antibióticos correspondientes de la cepa y del cósmido de las bacterias obtenidas de los nódulos, no se encontraron incongruencias. Por otro lado, es de hacer notar, que este fenotipo está claramente confinado a una zona particular situada en el extremo del fragmento de EcoRI de 5.5 kb y en el fragmento EcoRI de 0.6 kb aledaño al de 5.5 kb. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, estos ensayos deberán repetirse en sistemas que permitan una nodulación eficiente para definir si estas mutantes presentan una alteración real en el proceso de nodulación.

Desgraciadamente la hibridización con el probador para nodD no nos permitió localizar con exactitud la zona donde éste se encuentra (fig. 9C), puesto que el probador utilizado hibridizó con las dos bandas de EcoRI-BamHI que forman el fragmento de 5.5 kb. Esto puede tener dos explicaciones: 1) El gene nodD se podría encontrar justamente en el sitio de corte de BamHI, lo que haría que en la hibridización detectáramos ambas bandas; 2) ya que el probador utilizado, además de contener a nodD completo posee 1.4 kb de la secuencia aledaña a este gene, se podría presentar una señal de hibridización en ambas bandas por una zona de homología con la secuencia vecina a nodD de R. phaseoli además de la del propio nodD. Nuevamente, lo que se propone es la utilización de

algún probador intragénico de nodD para determinar su localización más exactamente.

Es de hacer notar que ninguna de las inserciones en este fragmento causaron un fenotipo Nod⁻ absoluto. La cepa CFN2001 de R. phaseoli que contiene a los cósmidos con las diferentes inserciones, no contiene el plásmido simbiótico (Tabla 2) y ninguna copia del gene nodD (fig. 10A), aunque se ha descrito que R. phaseoli posee por lo menos dos copias del gene (Rodríguez Quiñones et al., 1987) y Cevallos et al., enviado han detectado tres bandas de hibridización con el probador para este gene. En los casos en que existe una sola copia del gene nodD, las mutaciones en el mismo, ocasionan un fenotipo Nod⁻ como en R. leguminosarum y R. trifolii (Tabla 2, Rossen et al., 1987). Por lo tanto, dado que la cepa que utilizamos como receptora de los cósmidos mutagenizados no llevaba ninguna copia de nodD y que la única existente se encontraba en los cósmidos, se esperaba que inserciones en el fragmento EcoRI de 5.5 kb que hibridizaba con el probador de nodD, causaran un fenotipo Nod⁻. Por otro lado, Cevallos et al., describen el cósmido pSM927 que no posee ninguna copia de nodD y este cósmido en la cepa CFN2001 (pSim⁻) es capaz de nodular frijol. Por estas razones, sugerimos que en R. phaseoli, nodD no es indispensable para que la nodulación se lleve a cabo. Si esta afirmación es cierta, se abren una gran cantidad de preguntas. Por ejemplo, habría que explicar cómo es la regulación transcripcional de los genes en R. phaseoli para

los que se ha visto que la presencia de un producto funcional del gene nodD es indispensable para su expresión, como es el caso de los operones nodABC y nodFE y nodH y nodM (Rossen et al., 1987). Para este propósito será de gran utilidad determinar la actividad de β galactosidasa de las fusiones del gene lacZ contenido en el bacteriófago MudIIPR13 con zonas de posible promoción de transcripción y traducción en las distintas inserciones del pSM991.25. Otra interrogante sería la "utilidad" de la existencia de dos o tres copias de secuencias homólogas al gene nodD de otras especies en R. phaseoli así como el determinar la funcionalidad del o los genes nodD en esta especie.

Sin embargo, aún existe la posibilidad de que en el fragmento de EcoRI de 5.5 kb del pSM991.25 no exista ninguna secuencia homóloga a nodD, debido a que, como se mencionó, el probador utilizado (fig. 8) no esté detectando al gene nodD sino a una secuencia contigua a este gene, presente en el fragmento de 5.5 kb de EcoRI. Para aclarar este punto, se hacen indispensables las hibridaciones de este fragmento con probadores intragénicos de nodD o la complementación de mutantes en este gene, donde pudiéramos asegurar que el único nodD presente fuera el que se encontrara en este fragmento de 5.5 kb.

Finalmente, las inserciones de los pMV18 y 19 en el fragmento EcoRI de 2 kb y las de los pMV 20, 22, 25.1, 25.3 y 26 en el fragmento EcoRI de 3.5 kb, presentan un fenotipo de nodulación normal (Nod⁺), por lo que concluimos que estas zonas no contienen

información necesaria para la formación y desarrollo del nódulo.

Las hibridaciones de los DNAs totales de la cepa CFN2001 con los diferentes cósmidos utilizando como probador el pSM991.25, demostraron que las inserciones se mantuvieron estables y que la misma inserción mapeada en los cósmidos purificados de la cepa de E. coli M8820 Mu fué transferida intacta a la cepa CFN2001 de R. phaseoli.

CONCLUSIONES

El cósmido pSM991.25 contiene un fragmento del plásmido simbiótico de la cepa CE3 de *R. phaseoli* que presenta dos regiones indispensables para la formación y el desarrollo de los nódulos en (*Phaseolus vulgaris* L.) Cv. Negro Jamapa.

La primera de ellas contiene los genes nodABC comunes en una zona de aproximadamente 3 kb dentro de un fragmento de 6.8 kb de EcoRI.

La distribución de estos genes es similar a la encontrada en otras Rizobiáceas (fig. 1)

La presencia del gene nodB entre nodA y C, deberá ser corroborada más directamente.

La otra región indispensable para la nodulación está presente en un fragmento de EcoRI de 3.5 kb. Por el tamaño de la zona mutagenizada que causa un fenotipo Nod⁻, esta región parece contener un solo gene nod. Este gene capacita a *R. meliloti* para nodular frijol, por lo que se le ha llamado gene h_{sn} o de especificidad de nodulación de un hospedero determinado. Por el momento, no se sabe si este gene es equivalente a alguno de los descritos en otras Rizobiáceas.

El fragmento de EcoRI de 5.5 kb del pSM991.25 que podría contener al gene nodD, no es indispensable para la formación y desarrollo de los nódulos, aunque las inser-

ciones en dos zonas de este fragmento ocasionan fenotipos de nodulación alterados que hay que confirmar en sistemas de ensayo que permitan detectar alteraciones sutiles en el desarrollo del proceso. Finalmente, al igual que para el gene nodB, la presencia del gene nodD en el pSM991.25 deberá ser corroborada más directamente para poder establecer la funcionalidad de este gene en las fases iniciales de la nodulación.

El estudio de una región del plásmido simbiótico de la cepa CE3 de R. phaseoli, nos ha permitido localizar la información mínima necesaria para la iniciación y desarrollo de los nódulos en Phaseolus vulgaris.

REFERENCIAS

- Bauer, WD. 1981. The infection of legumes by rhizobia. *Ann Rev Plant Physiol* 32, 407.
- Bauer, WD, TV Bhuvaneshwari, HE Calvert, IJ Law, NAS Malik y SJ Vesper. 1985. Recognition and infection by slow growing bacteria. En "Nitrogen Fixation Research Progress", ed. HJ Evans, PJ Bottomley, WE Newton. pp. 247. Amsterdam: Nijhoff.
- Bhuvaneshwari TV, GB Turgeon, WD Bauer. 1980. Early events in the infection of soybeans (Glycine max L. Merr). *Plant Physiol* 66,1027.
- Bhuvaneshwari TV y B Solheim. 1985. Root hair deformations in the white clover/ Rhizobium trifolii symbiosis. *Physiol Plant* 63, 25.
- Bergmann, H, E Freddie y DPS Verma. 1983. Nodulin-35: A sub-unit of nodule-specific uricase (uricase II) induced and localized in uninfected cells. *EMBO J* 2, 2335.
- Birnboim HC y J Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Ac Res* 7, 1513.
- Bisseling T., RC Van Den Bos, A Van Kammen, M Van der Ploeg, P Van Duijn y A Houwers. 1977. Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids and corresponding broth-cultured Rhizobium bacteria. *J Gen Microbiol* 101, 79.
- Bisseling T, C Been, T Klugkist, A Van Kammen y K Nadler. 1983. Nodule-specific host proteins in effective and ineffective root nodules of Pisum sativum. *EMBO J* 2, 961.
- Broughton WJ y MJ Dilworth. 1971. Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125, 1075.
- Campos F, J Padilla, M Vázquez, JL Ortega, C Enriquez y F Sánchez. 1987. Expression of nodule-specific genes in Phaseolus vulgaris L. *Plant Mol Biol* 9, 521.
- Casadaban MJ. 1975. Fusion of the Escherichia coli lac genes to the ara promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 809.
- Casadaban MJ. 1976. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in E. coli using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 104, 541.
- Cevallos MA, A Dávalos, G Espin, J Sepúlveda y C Quinto. Characterization of Rhizobium phaseoli-Sym plasmid sequences involved in nodule morphogenesis and host range specificity. *Enviado*.

Dart PJ. 1974. The infection process. En "The Biology of Nitrogen Fixation" ed. A Quispal. pp 381. Amsterdam: North Holland.

Dazzo FB, GL Truchet, JE Sherwood, EM Hrabak y AE Gardiol. 1982. Alteration of the trifoliin A-binding capsule of Rhizobium trifolii 0403 by enzymes released from clover roots. Appl Environ Microbiol 44, 478.

Dazzo F, R Hollingsworth, S Philip-Hollingsworth, M Robeles, T Olen, M Djordjevic y B Rolfe. 1988. Recognition processes in the Rhizobium trifolii-white clover symbiosis. En "7th International Congress on N-Nitrogen Fixation. Köln, FRG.

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

Djordjevic MA, RW Innes, CA Wijffelman, PR Schofield y BG Rolfe. 1986. Modulation of specific legumes is controlled by several distinct loci in Rhizobium trifolii. Plant Mol Biol 6, 389.

Djordjevic MA, DW Gabriel y BG Rolfe. 1987a. Rhizobium: the refined parasite of legumes. Ann Rev Phytopathol 25, 145.

Djordjevic MA, JW Redmond, M Batley y BG Rolfe. 1987b. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii. EMBO J 6, 1173.

Djordjevic MA, Redmond JW, Battley M, Rolfe B. 1987c. Clovers secrete specific phenolic compounds which stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii. Eur Mol Biol Org J. In press.

Egelhoff TT y S Long. 1985. Rhizobium meliloti nodulation genes: identification of nodDABC gene products, purification of nodA protein, and expression of nodA in Rhizobium meliloti. J Bacteriol 164, 591.

Gottfert M, B Horvath, E Kondorosi, F Rodriguez-Quinones y F Kondorosi. 1986. At least two nodD genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti. J Mol Biol 191, 411.

Govers S, T Gloudemans, M Moerman, A Van Kammen y T Bisseling. 1985. Expression of plant genes during the development of pea root nodules. EMBO J 4, 861.

Govers F, M Moerman, JA Downie, P Hooykaas, HJ Franssen, J Louwrese, A van Kammen y T Bisseling. 1986. Rhizobium nod genes are involved in inducing an early nodulin gene. Nature 323, 564.

Groisman E y MJ Casadaban. 1986. Mini-Mu bacteriophage with plasmid replicons for in vivo cloning and lac gene fusing. J Bacteriol 168, 357.

Hirsch AM, D Drake, TW Jacobs y SR Long. 1985. Nodules are induced on alfalfa roots by Agrobacterium and Rhizobium trifolii containing small segments of the Rhizobium meliloti nodulation region. J Bacteriol 161, 223.

Horvath B, E Kondorosi, M John, J Schmidt, I Torok, Z Gyorgyal, I Barabas, V Wieneke, J Schell y A Kondorosi. 1986. Organization, structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa. Cell 46, 335.

Jordan DC. 1984. Rhizobiaceae. En Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9a. ed., Kreig, NR y Holt HC. Eds Williams y Wilkins, Baltimore. 234.

Kondorosi E, Z Banfalvi y A Kondorosi. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti: identification of nodulation genes. Mol Gen Genet 193, 445.

Kumarashinge RMK y PS Nutman. 1977. Rhizobium-stimulated callose formation in clover root hairs and its relation to infection. J Exp Bot 28, 961.

Lang-Unnasch N y FM Ausubel. 1985. Nodule-specific polypeptides from effective alfalfa root nodules and from ineffective nodules lacking nitrogenase. Plant Physiol 77, 833.

Lara M, H Porta, J Padilla, J Folch y F Sánchez. 1984. Heterogeneity in glutamine synthetase polypeptides in Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol 76, 1019.

Legocki RP y DPS Verma. 1980. Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium leguminosarum symbiosis. Cell 20, 152.

Lewin A, C Rosenberg, H Meyer ZA, CH Wong, L Nelson, JF Manen, J Stanley, DN Dowling, J Dénarie y WJ Broughton. 1987. Multiple host-specificity loci of the broad host-range Rhizobium sp. NGR234 selected using the widely compatible legume Vigna unguiculata. Plant Mol Biol 8, 447.

Lizardi P, R Binder y SA Short. 1984. Preparative isolation of DNA and biologically active mRNA from DEAE-membrane. Gene Anal Tech 1, 22.

Maniatis T. EF Fritsch y J Sambrook. 1982. En "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Martinez E, D Romero, R Palacios. The Rhizobium genome. Som-tido a publicación.

- Miller JM. 1972. En "Experiments in Molecular Genetics" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Moerman M, JP Nap, F Govers, R Schilperoort, A van Kammen y T Bisseling. 1987. Rhizobium nod genes are involved in the induction of two early nodulin genes in Vicia sativa root nodules. Plant Mol Biol 9, 171.
- Murooka Y, N Takizawa y T Harada. 1981. Introduction of bacteriophage Mu into bacteria of various genera and intergeneric gene transfer by RP4::Mu. J Bacteriol 145, 358.
- Nayudu M y BG Rolfe. 1987. Analysis of R-primes demonstrates that genes for broad host range nodulation of Rhizobium strain NGR234 are dispersed on the Sym plasmid. Mol Gen Genetics 206, 326.
- Newcomb W. 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. Int Rev Cytol Suppl 13, 247.
- Nieuwkoop AJ, Z Banfalvi, N Deshmane, D Gerhold, MG Schell, KM Sirotkin y G Stacey. 1987. A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of Bradyrhizobium japonicum. J Bacteriol 169, 2631.
- Noel KD, A Sánchez, L Fernández, J Leemans y M Cevallos. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertion. J Bacteriol 158, 148.
- Palacios R, C Quinto, H de la Vega, M Flores, L Fernández, M Hernández, T Ballado y G Soberón-Chávez. 1983. General organization of nitrogen fixation genes in Rhizobium phaseoli. En "Molecular genetics of the bacteria-plant interaction", ed. A Puhler. Springer Verlag, Berlin.
- Pierce M, WD Bauer. 1983. A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. Plant Physiol 73, 286
- Quinto C, H de la Vega, M Flores, L Fernández, T Ballado, G Soberon y R Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature 299, 724.
- Quinto, C, H de la Vega, M Flores, J Leemans, MA Cevallos, MA Pardo, R Aspiroz, MA Girard, E Calva y R Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in Rhizobium phaseoli. Proc Natl Acad Sci USA. 82, 1170.
- Ratet P y F Richaud. 1986. Construction and uses of a new transposable element whose insertion is able to produce gene fusions with the neomycin-phosphotransferase-coding region of Tn903. Gene 42, 185.
- Redmond JR, M Batley, MA Djordjevic, RW Innes, PL Kuempel, y

BG Rolfe. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium. Nature 323, 632.

Ridge RW, y BG Rolfe. 1986. Sequence of events during the infection of the tropical legume Macroptilium atropurpureum by the broad-host-range, fast-growing Rhizobium ANU240. J Plant Physiol 122, 121.

Robertson JG y KJF Farnden. 1980. Ultrastructure and metabolism of the developing root nodule. En "The Biochemistry of Plants" Vol. 5 ed BJ Mifflin. pp 65. London: Academic Press.

Robertson JG, P Lyttleton. 1982. Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover (Trifolium repens cultivar Grasslands Huia). J Cell Sci 58, 63.

Rodriguez-Quinones F, Z Banfalvi, P Murphy y A. Kondorosi. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in Rhizobium. Plant Mol Biol 8, 61.

Rossen L, EO Davis y AWB Johnston. 1987. Plant-induced expression of Rhizobium genes involved in host specificity and early stages of nodulation. TIBS 12, 430.

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

Scott FK. 1986. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont Bradyrhizobium sp. (Parasponia). Nucl Ac Res 14, 2905.

Spaink HP, RJH Okker, CA Wijffelman, E Pees y BJJ Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the Rhizobium leguminosarum Sym plasmid pRLiJI. Plant Mol Biol 9, 27.

Swanson JA, JK Tu, J Ogawa, R Sanga, RF Fisher y SR Long. 1987. Extended region of nodulation genes in Rhizobium meliloti 1021. I. Phenotypes of Tn₅ insertion mutants. Genetics 117, 181.

Thummler F y DPS Verma. 1986. En "Third International Symposium of the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions". Montreal, Canadá.

Turgeon BG, WD Bauer. 1982. Early events in the infection of soybean by Rhizobium japonicum. Time course and cytology of the initial infection process. Can J Bot 60, 152.

Verma DPS y AK Bal. 1976. Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in soybean root nodules. Proc Natl Acad Sci USA 73, 3843.

Yelton MM, JT Mulligan y SR Long. 1987. Expression of Rhizobium meliloti nod genes in Rhizobium and Agrobacterium backgrounds. J Bacteriol 169, 3094.