

CFN.28
TD
1988
ej. 2



Universidad Nacional Autónoma de México

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado

ANALISIS DE PLASMIDOS SIMBIOTICOS EN

Rhizobium phaseoli

T E S I S

Que para obtener el Grado de Doctor en
Investigación Biomédica Básica

p r e s e n t a

SUSANA BROM KLANNER

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Memo

porque ha llenado mi vida
de intensas emociones,
la ha cubierto de amor,
y la ha salpicado de alegría.

Con el recuerdo de Mónica.

Agradecimientos

Agradezco a mi padre el apoyo que siempre me ha brindado, a Evi, que me quiere, a mi "segunda" familia por todo el cariño que me ha ofrecido.

A Jaime Mora y Rafael Palacios el interés que siempre han mostrado en mi formación académica, así como muchos años de una intensa amistad.

A David, Brenda, Lorenzo, Yolanda, Maluye y Oscar, por su incondicional cariño, comprensión y amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio, por nuestra cotidiana convivencia.

A Esperanza Martínez, Daniel Piñero, Carmen Gómez, Alejandra Covarrubias y Federico Sánchez el interés que mostraron al revisar esta tesis.

A Lucy, por su siempre amable y eficiente ayuda.

Finalmente, quiero agradecer muy profundamente a Beatriz por todo lo que me enseña y alegra mi vida diariamente.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular
del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la
U.N.A.M.

INDICE

| | |
|---|----|
| Introducción: | 1 |
| Resultados: | 19 |
| 1. S. Brom, E. Martínez, G. Dávila, and R. Palacios Narrow and broad host-range symbiotic plasmids of <u>Rhizobium</u> spp. strains that nodulate <u>F. vulgaris</u> publicado en: Applied and Environmental Microbiology, May, 1988, p. 1280-1283. | |
| 2. Comparación estructural de plásmidos simbióticos. | |
| Discusión: | 22 |
| Bibliografía: | 29 |
| Tabla: | 58 |
| Figuras: | 59 |

INTRODUCCION

1.- Generalidades del proceso simbiótico.

Las bacterias del género Rhizobium son capaces de establecer una interacción específica con raíces de plantas leguminosas, para formar unas estructuras denominadas nódulos, donde las bacterias diferenciadas a bacteroides reducen el nitrógeno a amonio, el cual es asimilado por la planta.

Para la formación de un nódulo efectivo, donde se lleve a cabo fijación de nitrógeno, ocurren los siguientes eventos:

Inicialmente las bacterias se adhieren a los pelos - - radiculares. Se ha sugerido que algunos polisacáridos de la superficie celular de la bacteria intervienen en este proceso de adhesión. Los rhizobia inducen enroscamiento de los pelos radiculares, posteriormente se forma una estructura tubular de origen vegetal llamada hilo de infección que lleva a las bacterias a través de diversas capas celulares, hasta llegar a las células corticales, cuya proliferación ha sido inducida previamente; allí, el hilo de infección se ramifica y las bacterias son vertidas al citoplasma y rodeadas por una membrana de origen vegetal. Finalmente las bacterias se diferencian a bacteroides que fijan nitrógeno atmosférico con la enzima nitrogenasa e interactúan metabólicamente con la planta - - (Robertson et.al., 1985, Martínez et.al., 1988).

También se han descrito otras estrategias para nodulación.

En la leguminosa acuática Neptunia oleracea (Bauer, 1981), en - - Arachis sp. (Chandler, 1978), en Stylosanthes y Parasponia (Bauer, 1981), no se forman hilos de infección y las bacterias entran a las células vegetales por penetración intercelular.

El inicio de la interacción bacteria-planta requiere de la expresión de algunos genes de Rhizobium, los genes comunes de -- nodulación (nodABCD). Mutaciones en estos genes dan como resultado bacterias incapaces de formar nódulos (Jacobs et.al., 1985, Bachem et.al., 1985, Downie et.al., 1985, Stacey et.al., 1987, Marvel et.al., 1987, Holsters et.al., 1987), debido a que no se inducen las respuestas primarias de la planta, como son el enroscamiento de pelos radiculares y la proliferación meristemática (Long et.al., 1982, Djordjevic et.al., 1985, Truchet et.al., 1985, Rossen et.al., 1984). Se ha descrito la presencia de los genes nod comunes en diferentes cepas de R. meliloti (Long et.al., 1982, Truchet et.al., 1985), R. leguminosarum (Downie et.al., 1985, Rossen et.al., 1984), R. trifolii (Djordjevic et.al., 1985, Schofield et.al., 1984), R. phaseoli (Rodríguez-Quiñones et.al., 1987, Quinto et.al., 1987, Girard et.al., 1988), R. fredii (Rodríguez-Quiñones et.al., 1987, Ramakrishnan et.al., 1986), Rhizobium sp. de amplio rango de nodulación (Bachem et.al., 1985), Bradyrhizobium (Russell et.al., 1985, Scott, 1986) e inclusive en Azospirillum (Vanstockem et.al., 1987).

Los genes nod comunes son funcionales inter-especies, ya que mutaciones en estos genes de una especie de Rhizobium pueden ser complementadas por los genes de otra especie de Rhizobium o in-

clusiva de Bradyrhizobium. La complementación se puede llevar a cabo tanto con los plásmidos simbióticos (Sim) completos, como con los genes clonados en plásmidos u otros vehiculos moleculares (Banfalvi et.al., 1981, Kondorosi et.al., 1984, Djordjevic - - et.al., 1985, Russell et.al., 1985, Fisher et.al., 1985). Se ha comparado la secuencia de aminoácidos deducida a partir de datos de secuencia de DNA de los genes nodABC de R. leguminosarum, R. trifolii y R. meliloti, encontrándose que presentan una alta homología: entre 65 y 81% (Torok et.al., 1984, Egelhoff et.al., 1985, Shearman et.al., 1986, Schofield et.al., 1986).

Los genes nod comunes no se expresan cuando las bacterias se encuentran en vida libre. su expresión se induce por flavonoides exudados por las plantas (Mulligan et.al., 1986, Innes et.al., 1985, Rossen et.al., 1985) y requiere del producto del gene nodD (Mulligan et.al., 1985, Rossen et.al., 1985, Spaink et.al., 1987. nodD se expresa constitutivamente en R. meliloti (Mulligan et.al., 1985) y se autorregula en R. leguminosarum (Rossen et.al., 1985) y en R. trifolii (Spaink et.al., 1988).

La regulación fina de los genes nod comunes parece ser muy importante, ya que una dosis génica incrementada de nodABC en R. leguminosarum no incrementa la nodulación sino que tiene un efecto inhibitorio (Knight et.al., 1986). Cepas de Escherichia coli que sobreproducen el producto de nodC están afectadas en su crecimiento (John et.al., 1985).

El gene nodD se encuentra presente en más de una copia en:

R. meliloti (Gottfert et.al., 1986, Honma et.al., 1987), *R. fredii* (Appelbaum et.al., 1986), *R. trifolii*, *R. phaseoli* y *Rhizobium* sp. (cepa MIK3030) (Rodriguez-Quir6nes et.al., 1987), *R. phaseoli* (Girard et.al., 1988). Se han construido dobles y triples mutantes *nodD*⁻ de *R. meliloti*, demostrando que la - - nodulaci6n de las mutantes varia en diferentes hu6spedes y que las 3 copias de *nodD* son funcionales (Honma et.al., 1987, Honma and Ausubel, 1987). *Bradyrhizobium japonicum* (USDA123) y *R. japonicum* (USDA191) contienen 2 copias de *nodD* con distintas funciones regulatorias (Appelbaum et.al., 1988), entre las cepas de *R. loti* hay algunas de amplio espectro y otras de espectro restringido de nodulaci6n, derivadas *nodD*⁻ de estas 6ltimas son incapaces de nodular (*Nod*⁻), mientras que mutantes *nodD*⁻ de las cepas de amplio espectro son *Nod*⁺*Fix*⁻ (incapaces de fijar nitr6geno) en un hu6sped y *Nod*⁺*Fix*⁺ en otro (Scott et.al., 1988). La introducci6n del gene *nodD* proveniente de la cepa de amplio espectro NGR 234 a *R. trifolii*, le permite nodular otras plantas adem6s de tr6bol (Nayudu et.al., 1988). Todos estos reportes apoyan la sugerencia de que las distintas copias de *nodD* difieren en su capacidad de respuesta a los inductores presentes en distintas plantas (Honma et.al., 1988). Tambi6n se ha propuesto que hay una correlaci6n entre el rango de nodulaci6n y el tipo de flavona; especifcamente, se sugiere que la expresi6n de genes *nod* en especies de espectro de nodulaci6n restringido requiere de flavonas con sustituciones especifcas, mientras que la expresi6n de estos genes de cepas de amplio espectro puede ser estimulada

por fenoles más simples y ampliamente distribuidos (Lestrangle et.al., 1988).

Se han descrito también otra serie de genes que participan en el proceso de nodulación, estos genes se han denominado hsn (genes de especificidad de huésped). Mutaciones en estos genes producen un retardo en el tiempo de nodulación (Debellé et.al., 1986, Downie et.al., 1985, Horvath et.al., 1986, Batut et.al., 1985). Se ha demostrado que la transferencia de genes hsn entre diferentes cepas de Rhizobium altera su rango de huéspedes. Por ejemplo, una cepa de R. meliloti que lleva los genes hsn de un Rhizobium tropical de amplio rango de huéspedes (MPIK3030) y que carece de sus propios genes hsn, amplía su rango de huéspedes (Bachem et.al., 1986) a su vez, la cepa MPIK3030 complementada con la región hsn de R. meliloti es capaz de inducir la formación de estructuras tipo nódulo, que carecen de hilos de infección, bacteroides y son Fix⁻, en alfalfa (Putnoky et.al., 1986). Los genes hsn de R. meliloti al ser introducidos a R. trifolii, les permiten nodular alfalfa e inhiben la nodulación de trébol, aunque la introducción de la región hsn de R. trifolii a R. meliloti no altera su rango de huéspedes (Innes et.al., 1987).

En la región 5' de varios genes nod y hsn se han encontrado unas secuencias altamente conservadas, de aprox. 50 pares de bases ("nod box"). Estas secuencias parecen ser las responsables de la regulación positiva coordinada durante los eventos tempranos de la nodulación (Rolfe et.al., 1986, Downie et.al., 1986, Kondorosi et.al., 1987).

En Klebsiella pneumoniae los genes estructurales de la nitrogenasa: nifHDK se encuentran organizados en un operón (MacNeil et.al., 1978, Merrick et.al., 1978, Elmerich et.al., 1978). Esta misma forma de organización se encuentran en R. meliloti (Corbin et.al., 1982, Corbin et.al., 1983, Torok et.al., 1981), R. trifolii (Scott et.al., 1982), R. leguminosarum (Hontelez et.al., 1987), R. phaseoli (Quinto et.al., 1985, Segovia, 1988). En Bradyrhizobium el gene nifH se encuentra separado de los genes nifDK (Scott et.al., 1983, Kaluza et.al., 1983). En varias especies de Rhizobium se han encontrado otros genes que presentan homología a genes nif de Klebsiella, como nifB y nifEN (Rossen et.al., 1984, Buikema et.al., 1987, Hennecke et.al., 1987).

En Klebsiella, el producto de nifA actúa como activador positivo de todos los demás genes nif, a excepción de él mismo y de nifL (Roberts et.al., 1980, Buchanan-Wollaston et.al., 1981). El gene nifA se encuentra sujeto al sistema general de regulación nitrogenada ntr, ya que se activa por ntrA y ntrC bajo condiciones de limitación de nitrógeno y de oxígeno (Dixon, 1984, Ausubel, 1984, Merrick, 1988). En R. meliloti y B. japonicum se ha descrito la presencia de secuencias homólogas a los genes ntrB y ntrC de Klebsiella (Szeto et.al., 1984, 1987a, 1987b).

Los genes nif de Rhizobium también están sujetos a regulación positiva. Se han propuesto modelos regulatorios que involucran la activación de genes nif por nifA en: R. meliloti (Kahn et.al., 1988, Ausubel et.al., 1988), Azorhizobium

caulinodans (de Bruijn et.al., 1988) y B. japonicum (Hennecke et.al., 1988). Los modelos presentan algunas variaciones, principalmente en cuanto a la participación del oxígeno como otro elemento de regulación (Huala et.al., 1988, Loroch et.al., 1988). A diferencia de lo que sucede en Klebsiella, en R. meliloti se ha encontrado que la inducción de los genes de nitrogenasa por el producto de nifA, es independiente del sistema ntrBC (Ditta et.al., 1987), a su vez, la inducción del gene nifA en respuesta a una baja concentración de oxígeno, dada tanto por condiciones de microaerobiosis como durante la simbiosis, parece estar mediada por los productos de los genes fixLJ, que se encuentran localizados junto a los genes fixGHIX (Batut et.al., 1988). Los datos sobre regulación de genes nif se han tratado de encajar en un modelo más general de sistemas regulatorios de dos componentes, donde hay un "sensor" de las condiciones ambientales, que "transmite" su información al "regulador" a través de la interacción del extremo carboxilo del sensor con el amino del regulador, el cual, directa o indirectamente regula la expresión de los genes involucrados (Ronson, et.al., 1987).

En R. meliloti se ha propuesto la existencia de una regulación coordinada entre la utilización de ácidos carboxílicos y la expresión de genes nif (Birkenhead et.al., 1988a, Birkenhead et.al., 1988b), posiblemente mediada por el producto del gene ntrA, el cual se requiere para transporte de ac. dicarboxílico, asimilación de nitrato y fijación simbiótica de nitrógeno (Ronson et.al., 1987).

También se han descrito otros genes que afectan la fijación de nitrógeno, pero que no presentan homología con ningún gene nif de Klebsiella: los genes fix. Los genes fixABC localizados junto a los genes estructurales de la nitrogenasa, se activan por nifA en R. meliloti (Ruvkun et.al., 1982). R. leguminosarum (Hontelez et.al., 1987, Shetgens et.al., 1985) y B. japonicum (Lamb et.al., 1986, Hennecke et.al., 1987, Fuhrmann et.al., 1985, Gubler et.al., 1986). Estos genes se encuentran altamente conservados: se han detectado secuencias homólogas en Azotobacter vinelandii (Gubler et.al., 1986 b) y Azospirillum (Hennecke et.al., 1987). Se ha propuesto que los productos de estos genes participan en el acoplamiento del transporte de electrones para la nitrogenasa (Earl et.al., 1987), aunque esto se ha puesto en duda, por estudios de la región fixABC de Azorhizobium caulinodans (Alexandre et.al., 1988).

Los genes fixGHIX, descritos en R. meliloti, R. leguminosarum y R. trifolii se encuentran localizados a 200 Kb (aprox.) de la región nod-nif en R. meliloti (Batut et.al., 1985, Kahn et.al., 1987). El análisis de la secuencia de estos genes sugiere que codifican para un complejo de unión a membrana, involucrado en un proceso redox esencial para la fijación de nitrógeno in planta (Kahn et.al., 1987).

En la región 5' de los genes fixABC se encuentran unas secuencias de aproximadamente 160 pb que están altamente conservadas (Earl et.al., 1987, Better et.al., 1985), estas secuencias se conservan también en otros promotores activados por nifA

(Better et.al., 1983). La regulación de los genes fixGHIX parece ser independiente del producto de nifA (David et.al., 1987).

Se han identificado también loci cromosomales involucrados en el proceso simbiótico, principalmente por mutagénesis al azar con el transposón Tn5. En R. phaseoli se han descrito dos tipos de mutaciones que afectan el desarrollo del nódulo. Uno de ellos se sugiere que correlaciona con una deficiencia en polisacárido extracelular (EPS) aunque estas mutantes se identificaron originalmente por su alteración en el desarrollo del nódulo, y no por ser EPS⁻, además de que la deficiencia en EPS depende del medio de cultivo de las células (Van den Bosch et.al., 1986). Recientemente se han identificado 3 regiones genéticas que afectan la biosíntesis de EPS; una de ellas afecta también síntesis de lipopolisacárido (LPS), solamente mutaciones en esta última dan lugar a formación de nódulos defectivos en frijol, lo que sugiere que la causa del defecto simbiótico en estas cepas de R. phaseoli es la falta de LPS silvestre. (Diebold et.al., 1988). Existen otros reportes de que mutaciones que resultan en carencia de LPS, afectan el desarrollo del nódulo (Noel et.al., 1986, Brink et.al., 1988).

Es interesante que las mutaciones Exo⁻ de R. leguminosarum biovar phaseoli, que en esta bacteria no afectan formación de nódulos, son Nod⁻ en chicharo y trébol, al transferirlos a R. leguminosarum biovar viceae y trifolii respectivamente. Al complementarlas a Exo⁺, se recupera la nodulación normal (Diebold et.al., 1988).

En *R. meliloti* la producción de EPS también participa en el proceso de nodulación; mutaciones en los genes exoA, exoB, exoF y exoH resultan en bacterias incapaces de inducir la formación de hilos de infección. Algunas de estas mutaciones están localizadas en cromosoma y otras en un megaplásmido diferente al Sim (Leigh et.al., 1985, Hynes et.a.l., 1986, Williams et.al., 1988). En este organismo se ha descrito un plásmido que parece estar involucrado en la producción de un EPS modificado. Este plásmido tiene un efecto positivo sobre la nodulación en alfalfa (Toro et.al., 1986). En la cepa de *Rhizobium* de amplio espectro ANU 240, los EPS también parecen jugar un papel importante en el proceso de nodulación (Rolfe et.al., 1986).

Además hay otros loci, involucrados en la biosíntesis de EPS, localizados en cromosoma (Leigh, 1987). En *R. leguminosarum* también se ha correlacionado la síntesis alterada de EPS y LPS con anomalías del proceso simbiótico (Priefer et.al., 1988). Mutantes de la cepa de *Rhizobium* de amplio espectro de nodulación NGR 234 que afectan la síntesis de EPS son incapaces de nodular (Gray et.al., 1988).

Un gene que afecta la producción de EPS:psi (inhibición de polisacárido), está localizado en el plásmido Sim de *R. phaseoli* y parece ser un regulador de genes, como EPS, que se expresan normalmente en vida libre, pero que deben estar reprimidos durante simbiosis (Borthakur et.al., 1985). psr (restauración de polisacárido) se encuentra localizado cerca de psi, utilizando fusiones psi::lacZ se ha demostrado que reprime su transcripción,

asimismo, revierte el fenotipo EPS⁻ de cepas con psi en multicopia (Borthakur et.al., 1987).

En R. meliloti se han identificado otros genes de nodulación, por homología estructural con genes de Agrobacterium tumefaciens, cuyos productos se requieren para la adhesión de la bacteria a las células vegetales. Mutaciones en estos genes de A. tumefaciens resultan en una carencia de $\beta(1\rightarrow2)$ glucano y en la incapacidad de formar tumores (Douglas et.al., 1985). En R. meliloti se identificaron secuencias homólogas a estos genes, localizadas en cromosoma (Palomares et.al., 1988), que se han denominado ndvA y ndvB; bacterias con mutaciones en estos genes son sensibles a baja osmolaridad (Dylan et.al., 1988) y forman nódulos que carecen de hilos de infección y de bacteroides, aunque producen cantidades normales de EPS (Dylan et.al., 1986). Se ha propuesto que el producto de ndvA se requiere para exportar el $\beta(1\rightarrow2)$ glucano de la célula, ya que se parece a proteínas de transporte que unen ATP (Stanfield et.al., 1988). En R. leguminosarum y R. phaseoli se han encontrado secuencias homólogas a ndvA y ndvB (Dylan et.al., 1986).

En R. meliloti se han descrito 2 regiones involucradas en simbiosis, que parecen ser importantes para infectividad y competitividad, que están localizadas en un plásmido diferente al Sim (Olivares et.al., 1988). También en R. leguminosarum biovar viceae hay evidencia de que un plásmido diferente al Sim lleva información genética importante para la competitividad en rhizosfera (Hynes et.al., 1988). En Azospirillum hay un plásmido de

aprox. 90 md. que lleva un gene con homologia a un gene hsp de R. meliloti (Vielle et.al., 1988). En B. japonicum se han descrito 2 nuevos genes involucrados en simbiosis, que cuando están mutados dan un fenotipo Fix⁻ y no hibridizan con genes nif, nod o fix descritos anteriormente (Ebeling et.al., 1988). En R. meliloti, B. japonicum y B. japonicum también se han descrito nuevos loci que afectan la expresión de genes nif (Rostas et.al., 1984, So et.al., 1987, Zimmerman et.al., 1983, Renalier et.al., 1987).

Es obvio que el proceso de la fijación simbiótica de nitrógeno es muy complejo, tratando de resumir un poco, podemos puntualizar lo siguiente:

- 1.- Se requiere la expresión de una serie de genes, para que se lleven a cabo los eventos iniciales del proceso de nodulación.
- 2.- Estos genes se regulan coordinadamente, y los comparten las diferentes bacterias que tienen el mismo mecanismo de infección.
- 3.- Uno de estos genes establece la comunicación entre los simbioses, ya que recibe una señal de la planta y la transmite a la bacteria, la cual responde induciendo la expresión de los genes mencionados en el punto No. 1.
- 4.- La capacidad de una bacteria "X" de responder a la señal de una planta "Y" determina la especificidad de la relación simbiótica.
- 5.- La relación simbiótica pone en contacto diferentes superfi-

cies celulares, algunas de las moléculas que constituyen esta superficie determinan, de alguna manera, que siga adelante dicha relación simbiótica.

- 6.- En el nódulo las bacterias se diferencian a bacteroides capaces de fijar nitrógeno atmosférico.
- 7.- La actividad de la nitrogenasa y la expresión de los genes que codifican para ella están altamente regulados, principalmente por nitrógeno, oxígeno y carbono, a través de los productos de una serie de genes, descritos en diferentes organismos fijadores de nitrógeno.

2.- Los plásmidos simbióticos en la población de Rhizobium.

Las Rhizobiaceas se han clasificado actualmente en 4 géneros: Rhizobium, Agrobacterium, Bradyrhizobium y Phyllobacterium (Jordan, 1984). Todas estas bacterias gram son capaces de interaccionar con plantas, induciendo hipertrofias corticales. Rhizobium y Bradyrhizobium forman nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de muchas leguminosas y en algunos casos en los troncos de los árboles. Phyllobacteria produce nódulos en las hojas de algunas plantas. Agrobacterium produce tumores en raíces y tallos de varias plantas dicotiledonias (Jordan, 1984).

Las bacterias del género Rhizobium y Bradyrhizobium originalmente se clasificaron en diferentes especies en base a su capacidad de nodular distintos huéspedes (Elkan, 1984). Esta clasificación tiene algunas limitaciones, como son la infección cruzada, la baja representatividad de plantas tomadas en cuenta

para la clasificación (aprox. 1% de las especies descritas de leguminosas noduladas) (Allen et.al., 1981) y la posibilidad de que una cepa cambie de especificidad dado que los determinantes simbióticos se encuentran codificados en plásmidos transferibles.

En base a resultados de taxonomía numérica (Graham, 1984, Moffet et.al., 1968), hibridización de DNA (Gibbins et.al., 1972, Jarvis et.al., 1980, Hollis et.al., 1981) y patrones de proteínas (Roberts et.al., 1980) de bacterias del género Rhizobium, se ha modificado la taxonomía anterior (Jordan, 1984). Las bacterias se han agrupado en base a similitud de RNA ribosomal 23S; el grupo 1 incluye a R. meliloti, R. fredii y R. leguminosarum biovar trifolii, viceae y phaseoli; el grupo 2 corresponde a R. loti y el grupo 3 está integrado por rhizobia de Galega sp. (Jarvis, et.al., 1985, Wedlock et.al., 1985). En el género Bradyrhizobium se han incluido a todas las especies de crecimiento lento.

Estudios de diversos laboratorios han mostrado que las bacterias capaces de nodular Phaseolus vulgaris forman un grupo muy heterogéneo; en base a taxonomía numérica (Catteau et.al., 1984), patrones de proteínas (Roberts et.al., 1980), resistencia a antibióticos (Beynon et.al., 1980), electroferotipos (Piñero et.al., 1988) y patrones de plásmidos (Martinez et.al., 1984). El análisis de diferentes aislados nativos ha mostrado que este grupo incluye cepas que difieren en su rango de nodulación y en el número de copias de los genes estructurales de nitrogenasa. De 49 diferentes cepas capaces de nodular P. vulgaris, se encontraron 2 a 3 copias de los genes nifHDK en 47 de ellas, las

cuales podían estar organizadas en cualquiera de 6 diferentes patrones. Solamente 2 cepas presentaban una copia única de estos genes (Martínez et.al., 1985). Las cepas que presentan reiteración de los genes de nitrogenasa son capaces de nodular efectivamente solamente a P. vulgaris, mientras que las cepas con copia única de los genes estructurales de nitrogenasa presentan un espectro más amplio de nodulación (Martínez et.al., 1985). Hemos denominado a estos grupos como tipo I y tipo II respectivamente. Otras características comunes entre estas cepas son: las de tipo I llevan los genes necesario para producción de melanina, en el plásmido Sim (E. Martínez, no publicado), las de tipo II son ácido y aluminio resistentes (Martínez et.al., 1985) y llevan en el plásmido Sim una secuencia homóloga al gene de indol-acetamida hidrolasa de A. tumefaciens (M.A. Pardo y E. Martínez, en preparación).

Este análisis sugiere que cepas con diferentes características son capaces de nodular efectivamente a P. vulgaris. Algunas de las diferencias se deben a los plásmidos y otras a la información genética cromosomal. Quedaría por responder cuál es la correlación funcional, si es que hay alguna, de estas diferentes entidades genómicas.

Con el objetivo de analizar funcionalmente a los plásmidos simbióticos, se han llevado a cabo experimentos de transferencia de plásmidos Sim a otras cepas de Rhizobium diferentes de la original o a otras bacterias capaces de interaccionar con plantas, como Agrobacterium.

Los plásmidos Sim de algunas cepas de R. leguminosarum, R. trifolii y R. phaseoli son capaces de auto-transferirse a alta frecuencia (Higashi, 1967, Johnston et.al., 1978, Beynon et.al., 1980); aunque ésta no es una característica común a todos los plásmidos Sim, ya que los plásmidos de otras cepas de R. phaseoli, R. trifolii, R. meliloti y R. fredii no son capaces de auto-transferirse (Kondorosi et.al., 1985, Appelbaum et.al., 1985). Para la movilización de plásmidos no auto-transferibles se han utilizado diferentes estrategias, como es la formación de cointegrados con un plásmido transferible, el R 68.45 (Scott et.al., 1982), o la introducción de una secuencia mob al plásmido que se desea transferir, junto con un plásmido que provea las funciones tra en trans. (Appelbaum et.al., 1985, Simon, 1984).

Los plásmidos Sim de cepas de la misma especificidad, normalmente complementan las funciones simbióticas de cepas del mismo tipo (Hooykaas et.al., 1981, Kondorosi et.al., 1982, Brewin et.al., 1980). Cuando se transfieren plásmidos Sim a cepas de diferente especificidad, los resultados son muy variables. En algunos casos se amplía el rango de huéspedes de la cepa receptora (Brewin et.al., 1980, Djordjevic et.al.1983, Johnston et.al., 1978, Lamb et.al., 1982, Hooykaas et.al., 1981, Appelbaum et.al., 1985), en otros casos el rango de especificidad cambia al perderse o modificarse el plásmido Sim original (Beynon et.al., 1980, Djordjevic et.al., 1982, Christensen et.al., 1983, Sadowsky et.al., 1985, Wang et.al., 1986).

La transferencia de plásmidos Sim a diferentes cepas de - - Agrobacterium genera transconjugantes que inducen la formación de estructuras "tipo nódulo" que carecen de bacterias intracelulares y son Fix⁻. (Hooykaas et.al., 1981, Kondorosi et.al., 1982, Truchet et.al., 1984, Van Brusel et.al., 1982); recientemente se ha mostrado que una transconjugante de Agrobacterium que lleva el plásmido Sim de la cepa CFN299, aislada originalmente de P. vulgaris, forma nódulos efectivos en frijol (Martinez et.al., 1987).

En general, podemos decir que los experimentos de transferencia de plásmidos simbióticos entre diferentes cepas de Rhizobium han contribuido a determinar que estos plásmidos llevan, si no toda, una gran parte de la información genética requerida para el establecimiento de una simbiosis efectiva, así como los genes que confieren la especificidad de nodulación. También han servido para determinar incompatibilidades físicas y funcionales entre diferentes plásmidos Sim.

3.- Objetivos.

En nuestro laboratorio estamos interesados en analizar diversos aspectos de la relación simbiótica entre Rhizobium y frijol. Uno de estos aspectos es el análisis de los plásmidos Sim de cepas capaces de interaccionar con P. vulgaris.

El objetivo del presente trabajo consistió en comparar funcionalmente los plásmidos Sim de diferentes cepas de Rhizobium, que compartían la característica de poder nodular al frijol, pero diferían tanto en la efectividad de esta nodulación como en el

origen de las cepas, ya que algunas fueron aisladas de nódulos de frijol, mientras que otras se obtuvieron a partir de nódulos de otras leguminosas.

El análisis del comportamiento de los diferentes plásmidos se llevó a cabo en un mismo fondo genómico y en ausencia de los otros plásmidos de las cepas de Rhizobium que pudieran interactuar con el Sim.

Para lograr esto, la estrategia utilizada fue la de transferir los plásmidos Sim a una cepa de A. tumefaciens que carecía de plásmidos endógenos. Se analizaron las propiedades simbióticas de las transconjugantes determinadas como capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno en P. vulgaris. También se llevó a cabo una comparación estructural de algunas regiones de los diferentes plásmidos Sim, para tratar de correlacionar el fenotipo de las cepas con sus propiedades funcionales y estructurales.

RESULTADOS

Narrow- and Broad-Host-Range Symbiotic Plasmids of *Rhizobium* spp. Strains That Nodulate *Phaseolus vulgaris*

SUSANA BROM,* ESPERANZA MARTINEZ, GUILLERMO DÁVILA, AND RAFAEL PALACIOS

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

Received 13 November 1987/Accepted 2 February 1988

***Agrobacterium* transconjugants containing symbiotic plasmids from different *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris* were obtained. All transconjugants conserved the parental nodulation host range. Symbiotic (Sym) plasmids of *Rhizobium* strains isolated originally from *P. vulgaris* nodules, which had a broad nodulation host range, and single-copy nitrogenase genes conferred a Fix⁺ phenotype to the *Agrobacterium* transconjugants. A Fix⁻ phenotype was obtained with Sym plasmids of strains isolated from *P. vulgaris* nodules that had a narrow host range and reiterated *nif* genes, as well as with Sym plasmids of strains isolated from other legumes that presented single *nif* genes and a broad nodulation host range. This indicates that different types of Sym plasmids can confer the ability to establish an effective symbiosis with *P. vulgaris*.**

Bacteria of the genus *Rhizobium* are capable of interacting with plant roots to form nitrogen-fixing nodules. *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* effectively nodulates *Phaseolus vulgaris*. The classification of the biovar is based largely, but not entirely, on host plant specificity. Results of studies from several laboratories (2, 4, 16) suggest that bacteria capable of nodulating *P. vulgaris* form a very heterogeneous group. Native isolates from *P. vulgaris* nodules differ in their nodulation host range and in nitrogenase (*nif*) gene copy number (13). Type I strains have a narrow nodulation host range and repeated *nif* genes, while type II strains have a broad host range, which includes *Phaseolus* and *Leucaena*, and have single-copy *nif* genes (13, 14). In several instances strains isolated from other tropical legumes (*Dalea leporina* and *Pachyrhizus erosus*) are able to elicit an effective symbiosis with beans (13). Some isolates from *Clitoria ternatea* or *Glycine max* cv. Jupiter form an ineffective symbiosis with *Phaseolus vulgaris* (see below).

The genetic information required for nodulation and nitrogen fixation in *Rhizobium* strains is encoded in plasmids known as symbiotic (Sym) plasmids (5, 9, 10). The Sym plasmids of different strains have been transferred to another plant-interacting bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*. Some of the transconjugants induced the formation of nodulelike structures (8, 11, 19, 20). Recently, it has been shown that an *Agrobacterium* transconjugant carrying the Sym plasmid of strain CFN299 (originally isolated from *P. vulgaris*) forms effective nodules on beans (12).

We present here results of an analysis of the Sym plasmids from eight *Rhizobium* strains isolated from *P. vulgaris* and other legumes. Each strain was able to nodulate and, in most cases, fix nitrogen with *P. vulgaris*. The Sym plasmids were transferred to an *Agrobacterium tumefaciens* plasmidless strain, and the symbiotic properties of the transconjugants were studied. These experiments allowed us to analyze the functional capacity of the Sym plasmids from the different strains with the same chromosomal background, devoid of the influence of other plasmids present in the *Rhizobium* parent strains.

To isolate *A. tumefaciens* transconjugants containing *Rhizobium* Sym plasmids, the different *Rhizobium* strains (Table 1) were marked with Tn5-*mob* by mating them with strain S17-1(pSUP5011) (18) and selecting for nalidixic acid (20 µg/ml), kanamycin (30 µg/ml), and neomycin (30 µg/ml) resistances. Transconjugants were obtained by mobilization to *A. tumefaciens* GM19023 (17) of random Tn5-*mob* mutants of each strain by using plasmid pJB3J1 (3) as a helper for mobilization, except in the case of strain CFN299, whose Tn5-*mob*-marked plasmids were mobilized without a helper. The transconjugants were selected in LB medium containing rifampin (100 µg/ml), kanamycin (30 µg/ml), and neomycin (30 µg/ml). Transconjugants were used to inoculate *P. vulgaris* plants en masse. *P. vulgaris* cv. Negro jamapa seeds were surface sterilized as described previously (13) and grown in 250-ml Erlenmeyer flasks with the agar medium described by Fahraeus (7), without added nitrogen, at 28°C. Plants were grown for 15 days. The number of nodules per plant was very variable, probably due to the fact that a mixture of transconjugants was used for inoculation. Single colonies were isolated from the nodules after cells diluted in 10 mM MgSO₄-0.01% (vol/vol) Tween 40 were plated.

The phenotypic markers of approximately 400 colonies isolated from nodules formed by each of the different strains were checked. All were rifampin, kanamycin, and neomycin resistant and produced 3-ketolactose. The 3-ketolactose production was assayed as described previously (1) by using liquid cultures in BYLA medium (13). This indicates that the cells that induced nodule formation were indeed the *Agrobacterium* transconjugants, as parental *Rhizobium* strains which failed to produce 3-ketolactose were never recovered from the nodules.

The plasmid profiles of the original *Rhizobium* strains (Fig. 1, lanes 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, and 16) and those of the transconjugants (Fig. 1, lanes 2, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 17, and 18) were determined by the procedure of Eckhardt (6). The Sym plasmid was identified because it conferred on the *Agrobacterium* transconjugants the ability to form nodules (see below) and also hybridized to *nif* gene sequences on Eckhardt (6)-type gels (data not shown). The Sym plasmid of some of the strains used was identified previously (12, 15).

* Corresponding author.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids | Isolated from: | Source or reference ^a |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| <i>Rhizobium</i> | | |
| CFN42 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 16 |
| CFN285 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 13 |
| CFN299 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | E. Martinez |
| CIAT899 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | P. Graham |
| CFN249 | <i>Dalea leporina</i> | 13 |
| CFN400 | <i>Clitoria ternatea</i> | E. Martinez |
| CFN401 | <i>Pachyrhizus erosus</i> | E. Martinez |
| USDA191 | <i>Glycine max</i> cv. Jupiter | H. H. Keyser |
| <i>Agrobacterium</i> | | |
| GMI9023 | | 17 |
| GMI9023(pCFN42d) | | This work |
| GMI9023(pCFN285b) | | This work |
| GMI9023(pCFN299a,c) | | This work |
| GMI9023(pCIAT899b) | | This work |
| GMI9023(pCIAT899a,b) | | This work |
| GMI9023(pCFN249a) | | This work |
| GMI9023(pCFN400a) | | This work |
| GMI9023(pCFN401b) | | This work |
| GMI9023(pUSDA191b) | | This work |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| S17-1(pSUP5011) | | 18 |
| 1830(pJB3J1) | | 3 |

^a Sources: E. Martinez, Departamento de Genetica Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico; Peter Graham, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; and Harold H. Keyser, Nitrogen Fixation and Soybean Genetics Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Md.

Agrobacterium transconjugants derived from strains CFN 42, CFN285, CFN249, and CFN401 contained only the Sym plasmid. Some of the strain CIAT899 transconjugants contained another plasmid, in addition to the Sym plasmid, while others contained the Sym plasmid alone. All the transconjugants of strain CFN299 contained both the Sym and another plasmid. The symbiotic properties of strain CFN299 have been analyzed previously (12). It was shown that the same phenomenon of plasmid coinheritance was observed in all cases after the selection of *Agrobacterium* transconjugants through plant passage. Note that the *Agrobacterium* transconjugants of this particular strain were

constructed without a helper plasmid. A possibility is that one of the other indigenous plasmids of the *Rhizobium* strain mobilizes the Sym plasmid.

In the case of *Rhizobium fredii* USDA191, some transconjugants with deletions in the Sym plasmid (Fig. 1, lane 18) were recovered. This deleted Sym plasmid hybridized with *nif* gene sequences on Eckhardt (6)-type gels (data not shown).

The *Rhizobium* strains and *Agrobacterium* transconjugants were assayed for their capacity to form nodules on *P. vulgaris* and *Leucaena leucocephala* var. K-8. The nodulation assay used for *L. leucocephala* was similar to that used for *P. vulgaris*.

All transconjugants were able to nodulate *P. vulgaris* (Table 2), although the number of nodules was always 70 to 80% lower than those in the parental strains. The nodules produced by strain GMI9023(pCFN42d) were analyzed by light microscopy. Infected cells, vascular bundles, and starch grains were observed (results not shown). The transconjugants conserved the host range of the *Rhizobium* parent. Transconjugants from strains CFN249, CFN299, CIAT899, and CFN400 nodulated *L. leucocephala*, while transconjugants from CFN42, CFN285, and CFN401 were unable to form nodules on this plant. The only exception was strain USDA191, whose transconjugants did not nodulate *L. leucocephala*. This may have been due to the poor nodulation shown by the parental *Rhizobium* strain (approx. 1 nodule per plant).

P. vulgaris whole nodulated roots were assayed for acetylene reduction at day 15 after inoculation, as described previously (13) (Table 2). Transconjugants carrying the Sym plasmids of type II strains CFN299 and CIAT899 were able to fix nitrogen. The results from strain CFN299 are in complete agreement with those previously reported by Martinez et al. (12). This nitrogen-fixing capacity was seen only when the plants were incubated at 28°C. At 21°C, nodulation was greatly diminished and the acetylene reduction capacity disappeared (data not shown) (12). We found that *Agrobacterium* sp. strain CIAT899 transconjugants resembled those of strain CFN299 in some characteristics such as their acetylene reduction activity and the frequent coinheritance of a 185- to 200-kilobase-pair plasmid.

On the other hand, nodules formed by transconjugants of type I strains CFN42 and CFN285 had a barely detectable acetylene reduction activity. The nodules formed by the

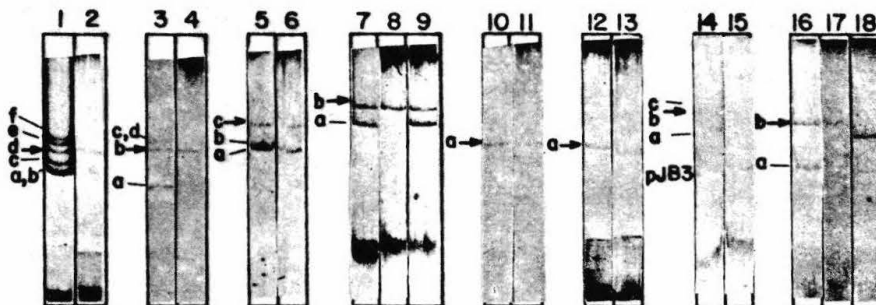


FIG. 1. Plasmid electrophoretic pattern of *Rhizobium* strains and *Agrobacterium* transconjugants on 0.7% agarose gels stained with ethidium bromide. Lanes: 1, CFN42; 2, GMI9023(pCFN42d); 3, CFN285; 4, GMI9023(pCFN285b); 5, CFN299; 6, GMI9023(pCFN299a,c); 7, CIAT899; 8, GMI9023(pCIAT899b); 9, GMI9023(pCIAT899a,b); 10, CFN249; 11, GMI9023(pCFN249a); 12, CFN400; 13, GMI9023(pCFN400a); 14, CFN401; 15, GMI9023(pCFN401a); 16, USDA191; 17, GMI9023(pUSDA191b); 18, GMI9023(pUSDA191b). Arrows indicate localization of the Sym plasmids.

TABLE 2. Nodulation and nitrogen fixation in *P. vulgaris* and *L. leucocephala* by *Rhizobium* strains and *Agrobacterium* transconjugants isolated from *P. vulgaris* nodules

| Strain | Nodulation in: | | Nitrogen fixation in <i>P. vulgaris</i> ^c |
|----------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| | <i>P. vulgaris</i> ^a | <i>L. leucocephala</i> ^b | |
| CNF42 | + | - | 100% |
| GM19023(pCFN42d) | + | - | 2% |
| CFN285 | + | - | 100% |
| GM19023(pCFN285b) | + | - | 1% |
| CFN299 | + | + | 100% |
| GM19023(pCFN299a,c) | + | + | 21% |
| CIAT899 | + | + | 100% |
| GM19023(pCIAT899b) | + | + | 9% |
| GM19023(pCIAT899a,b) | + | + | 11% |
| CFN249 | + | + | 100% |
| GM19023(pCFN249a) | + | + | ND |
| CFN400 | + | + | ND |
| GM19023(pCFN400a) | + | + | ND |
| CFN401 | + | - | 100% |
| GM19023(pCFN401a) | + | - | ND |
| USDA191 | + | + | ND |
| GM19023(pUSDA191b) | + | - | ND |

^a Nine plants were tested.

^b Three plants were tested.

^c Total acetylene reduction activity per plant in the transconjugants is reported compared with the corresponding values for the parental strain. The total activity of strain CFN42 was defined as 1: the relative activities of the other parental strains were as follows: CFN285, 1.2; CFN299, 3.6; CIAT899, 1.8; CFN249, 1.5; CFN401, 7.8. ND, Not detectable.

transconjugants of strains CFN249, CFN400, CFN401, and USDA191 (originally isolated from other legumes) had no reducing activity, although strains CFN249 and CFN401 formed nitrogen-fixing nodules on *P. vulgaris*. *Leucaena* nodules were not assayed for acetylene reduction.

The Sym plasmids of strains that nodulate *P. vulgaris* differ in *nif* gene copy number and nodulation host range (13, 14). The data presented here indicate that the plasmids also differ in the functional capacity conferred on the *Agrobacterium* transconjugants that carry them. Strains that were isolated originally from *P. vulgaris* nodules were of two types. Plasmids of type I strains have reiterated *nif* genes and a narrow host range (13) and confer only a barely detectable nitrogen fixation ability on the *Agrobacterium* transconjugants. Type II strains have single-copy *nif* genes and a broad nodulation host range (13) and confer a significant nitrogen fixation activity on transconjugants. The Sym plasmids of strains isolated from other legumes differed among themselves in the capacity of effective nodulation in *P. vulgaris*. They resembled those of type II strains, because they carry single *nif* genes (13), but differed because no nitrogenase activity was exhibited by the *Agrobacterium* transconjugants. Taken together, these data indicate that the genes necessary for the establishment of an effective symbiosis with *P. vulgaris* are found in different types of plasmids. Two of them were found in strains isolated originally from *P. vulgaris* nodules, and the others were found in *Rhizobium* sp. strains isolated from other legumes. It will be interesting to know whether these different types of Sym plasmids require a specific chromosomal background, a plasmid background, or both to optimally express themselves.

We are grateful to David Romero and Lorenzo Segovia for critically reviewing the manuscript and to Federico Sanchez for performing the light microscopy of the nodules. Seeds of *L. leucocephala* var. K-8 were kindly provided by B. Ben Bohloul (NiFATL Project).

Partial financial support for this research was provided by the National Research Council, U.S. National Academy of Sciences, through a grant from the U.S. Agency for International Development; by grant CII*-0104-MEX(A) from the La Communauté Economique Européenne; and by grants from the Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

LITERATURE CITED

- Bernaerts, M. J., and J. De Ley. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* (London) **197**:406-407.
- Beynon, J. L., J. E. Beringer, and A. W. B. Johnston. 1980. Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J. Gen. Microbiol.* **120**:421-429.
- Brewin, N. J., J. E. Beringer, and A. W. B. Johnston. 1980. Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**:413-420.
- Catteau, M., H. Khanaka, M. D. Legrand, and J. Guillaume. 1984. Contribution to the study of *Rhizobium* and *Agrobacterium* genus: numerical taxonomy, p. 330. In C. Veeger and W. E. Newton (ed.), *Advances in nitrogen fixation research*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands.
- Djordjevic, M. A., W. Zurkowski, J. Shine, and B. G. Rolfe. 1983. Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. *J. Bacteriol.* **156**:1035-1045.
- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**:584-588.
- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**:374-381.
- Hooykaas, P. J. J., F. G. M. Snijdwint, and R. A. Schilperoord. 1982. Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to and expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* **8**:73-82.
- Hooykaas, P. J. J., A. A. N. van Brussel, H. den Dulk-Ras, G. M. S. van Slogteren, and R. A. Schilperoord. 1981. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* (London) **291**:351-353.
- Johnston, A. W. B., J. L. Beynon, A. U. Buchanan-Wollaston, S. M. Setchell, P. R. Hirsch, and J. E. Beringer. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* (London) **276**:634-636.
- Kondorosi, A., E. Kondorosi, C. E. Pankhurst, W. J. Broughton, and Z. Banfalvi. 1982. Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* **188**:433-439.
- Martinez, E., R. Palacios, and F. Sanchez. 1987. Nitrogen fixing nodules induced by *Agrobacterium* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**:2828-2834.
- Martinez, E., M. A. Pardo, R. Palacios, and M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:1779-1786.
- Palacios, R., M. Flores, S. Brom, E. Martinez, V. Gonzalez, S. Frenk, C. Quinto, M. A. Cevallos, L. Segovia, D. Romero, A. Garciaarubio, D. Pinero, and G. Davila. 1987. Organization of the *Rhizobium phaseoli* genome, p. 151-156. In D. P. Verma and N. Brisson (ed.), *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. Martinus Nijhoff Publishers, Montreal.
- Quinto, C., H. de la Vega, M. Flores, L. Fernandez, T. Ballado, G. Soberon, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* (London) **229**:724-726.
- Roberts, G., W. T. Leps, L. E. Silver, and W. J. Brill. 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 39:414-422.
17. Rosenberg, C., and T. Hugnet. 1984. The pATC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol. Gen. Genet.* **196**:533-536.
 18. Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196**:413-420.
 19. Truchet, G., C. Rosenberg, J. Vasse, J. S. Julliot, S. Camut, and J. Denarie. 1984. Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: host specific nodulation by atypical infection. *J. Bacteriol.* **157**:134-142.
 20. Van Brussel, A. A. N., T. Tak, A. Wetselaar, E. Pees, and C. A. Wijffelman. 1982. Small leguminosae as test plants for nodulation of *Rhizobium leguminosarum* and other rhizobia and agrobacteria harbouring a leguminosarum Sym plasmid. *Plant Sci. Lett.* **27**:317-325.

2.- Comparación estructural de plásmidos simbióticos.

El cósmido pSM991, aislado por C. Quinto y Cols. (1985), contiene una de las regiones nif y los genes nod comunes del plásmido simbiótico de la cepa CFN42. Este cósmido complementa para nodulación a una derivada de la CFN 42 que carece del plásmido Sim. La región nod-nif de los plásmidos Sim de algunas de las cepas de Rhizobium se compararon por su patrón de hibridización al cósmido pSM991. En la Fig. 1A se puede observar que las 2 cepas tipo I (CFN42 y CFN285) presentan un patrón de hibridización idéntico, salvo por 1 banda que no aparece en la cepa CFN285, mientras que las 2 cepas tipo II presentan un patrón similar entre ellas, pero el número de bandas homólogas al pSM 991 es mucho menor que en el DNA de las cepas tipo I.

Otras regiones de los 2 tipos de plásmidos simbióticos se compararon por su patrón de hibridización con plásmidos recombinantes que llevan clonados fragmentos de DNA de la cepa CFN42 (Flores et.al., 1987). En la Fig. 1B se muestra el patrón de hibridización de las distintas cepas con el plásmido pMF101, la secuencia clonada en este plásmido se encuentra reiterada en el DNA de Rhizobium, estando algunas copias en el plásmido Sim y otras en cromosoma. Se puede observar que las 2 cepas tipo I contienen varias copias de esta secuencia, mientras que en una de las cepas tipo II, no se ve ninguna banda de homología y en la otra se ven 2 bandas tenues que estarían localizadas en el cromosoma; además hay una banda que presenta homología con el DNA

de la cepa de Agrobacterium, lo que se puede observar tanto en el DNA de las transconjugantes como en el carril donde se encuentra el DNA de la GMI9023. En la Fig. 1C se muestra el patrón de hibridización de todas las cepas con el plásmido PMF4, que lleva clonada una secuencia única del plásmido simbiótico de la cepa CFN42. En la cepa CFN285 esta secuencia también se encuentra presente en copia única, aunque localizada en un fragmento de otro tamaño. No se observa ninguna banda de hibridización con las cepas tipo II.

En la Fig. 2 se muestra la hibridización del cósmido pSM991, con DNA de cepas de Rhizobium aisladas de nódulos de leguminosas diferentes al frijol. Se puede observar que las cepas aisladas de Dalea leporina (CFN249) y Clitoria ternatea (CFN400) muestran solamente una banda de homología, mientras que las cepas CFN 401 (aislada de Pachyrhizus erosus) y USDA191 (Rhizobium fredii) muestran un nivel intermedio de homología con la región nod-nif del plásmido simbiótico tipo I.

Estos datos se encuentran resumidos en la Tabla 1, y nos muestran que estructuralmente podemos encontrar, por lo menos 4 tipos de plásmidos Sim:

- a) los de tipo I, que son muy homólogos entre sí
- b) los de tipo II, que son muy poco homólogos a los de tipo I
- c) de cepas aisladas de nódulos de otras leguminosas, que son muy poco homólogos a los tipo I
- d) de cepas aisladas de nódulos de otras leguminosas, que presentan una homología intermedia al plásmido Sim tipo I.

DISCUSION

En este trabajo se presenta el aislamiento y la caracterización de transconjugantes de Agrobacterium que llevan diferentes plásmidos simbióticos de cepas de Rhizobium capaces de nodular Phaseolus vulgaris. Para obtener estas transconjugantes, utilizamos a la planta como instrumento para seleccionar a las células que son capaces de inducir nodulación, de entre todo el resto de la población de transconjugantes.

Las transconjugantes de Agrobacterium derivadas de las cepas CFN42, CFN285, CFN249, CFN400 y CFN401 contenían solamente un plásmido. Algunas de las transconjugantes derivadas de la cepa CIAT899 contenían otro plásmido además del simbiótico. Todas las transconjugantes de la cepa CFN299 contenían otro plásmido además del simbiótico. Las propiedades simbióticas de la cepa CFN299 han sido analizadas previamente (Martínez et.al., 1987); al seleccionar transconjugantes de Agrobacterium en transferencias sucesivas por planta, se observó el mismo fenómeno de herencia ligada de algunos plásmidos. En experimentos llevados a cabo recientemente en el laboratorio, hemos encontrado que en 3 cepas diferentes, 1 de tipo I y 2 de tipo II, hay un plásmido que se auto-transfiere a una alta frecuencia ($10^{-3}, 10^{-2}$). Al comparar las frecuencias de transferencia de los diferentes plásmidos Sim marcados con Tn5, en presencia y en ausencia de sus respectivos plásmidos auto-transferibles, encontramos que estos plásmidos

auto-transferibles funcionan como "ayudadores" para la transferencia de los plásmidos simbióticos respectivos, ya que aumentan la frecuencia de transferencia de éstos entre 10 y 1000 veces.

También sabemos que, por lo menos en una de estas cepas existen algunas secuencias homólogas entre el plásmido simbiótico y el plásmido auto-transferible. Una posibilidad para explicar el efecto "ayudador" del plásmido auto-transferible es que las secuencias homólogas entre los 2 plásmidos permitan que se forme un cointegrado el cual se transfiera a alta frecuencia y se resuelva en la receptora. Una predicción que surge de esta posibilidad es que el efecto "ayudador" debía ser específico para el plásmido simbiótico y no para otros plásmidos presentes en las cepas de Rhizobium, a menos que también compartieran secuencias con el plásmido auto-transferible. Sería interesante también averiguar si el plásmido auto-transferible de una cepa de Rhizobium puede "ayudar" a transferir los plásmidos simbióticos de otras cepas o solamente tiene un efecto sobre el plásmido Sim de su cepa original. Por último, me gustaría saber que tan general es la presencia de un plásmido de este tipo en las diversas cepas de Rhizobium y si tienen algún papel en la selección o el mantenimiento de las cepas en la naturaleza.

El análisis de la capacidad de nodulación de las transconjugantes de Agrobacterium, mostró que en todos los casos se conservó el rango de huéspedes, indicando que el plásmido simbiótico contiene la información genética necesaria para la

especificidad de nodulación.

Es interesante que el ensayo de reducción de acetileno de nódulos formados por las diferentes transconjugantes mostró que los plásmidos simbióticos de las cepas CFN299 y CIAT899 correspondientes a lo que hemos llamado Rhizobium tipo II conferían a la cepa de Agrobacterium una capacidad significativa de reducción de acetileno. Esto se podría deber a que el plásmido Sim de tipo II es más "autosuficiente" que el de tipo I, porque lleve mayor cantidad o calidad de información genética requerida para la fijación. Por ejemplo, que ocurra algo similar a lo que se ha visto en R. meliloti, donde recientemente se ha descrito la existencia de un gene que codifica para una rhizopina en el plásmido Sim, su síntesis se regula coordinadamente con otros genes involucrados en simbiosis, por lo que se sugiere que participa en este proceso (Murphy et.al., 1988).

Otra posibilidad es que el cromosoma de Agrobacterium tenga alguna información genética que "complementa" mejor a los plásmidos Sim tipo II que a los tipo I, una última alternativa es que la eficiencia de los 2 tipos de plásmidos sea la misma, pero que la estabilidad del tipo II sea mucho mayor que la del tipo I. Los resultados obtenidos para la cepa CFN299 concuerdan con los reportados previamente por Martínez et.al., (1987). Esta capacidad de fijación de nitrógeno se observa solamente cuando las plantas se incuban a 28°C, porque cuando se mantienen a 21°C, la nodulación disminuye significativamente y la capacidad de reducción desaparece (Martínez et.al., 1987 y datos no

mostrados).

Los nódulos formados por transconjugantes de las cepas tipo I (CFN42 y CFN285) mostraron una actividad de reducción de acetileno apenas detectable. Los nódulos formados por las transconjugantes de las cepas CFN249, CFN400, CFN401 y USDA191 (originalmente aislados de otras leguminosas) no mostraron actividad de reducción de acetileno, a pesar de que las cepas CFN249 y CFN401 forman nódulos fijadores de nitrógeno en Phaseolus vulgaris.

La comparación estructural de algunas regiones de los plásmidos simbióticos de cepas tipo I mostró que hay una gran homología entre ellas.

Las diferencias en patrones de hibridización que se ven entre las cepas de Rhizobium y las transconjugantes se deben a que algunas de las bandas se encuentran localizadas en el cromosoma o en plásmidos diferentes al Sim, por lo que aparecen en las hibridizaciones del DNA de la cepa de Rhizobium y no el DNA de la transconjugante que solamente contiene el plásmido Sim. Se ha determinado la localización plásmidica y/o cromosomal de algunas secuencias reiteradas del genoma de una cepa de Rhizobium, en experimentos de hibridización de DNA de las transconjugantes que contienen cada uno de los diferentes plásmidos de una cepa con detectores de las secuencias reiteradas (Flores et.al., 1987, M. Girard, datos no publicados).

En experimentos realizados en el laboratorio, se ha demostrado que en el DNA de Rhizobium ocurren rearrreglos a alta

frecuencia, bajo condiciones de laboratorio (Flores, et.al., 1988). Este fenómeno no se incrementa al transferir los plásmidos Sim a Agrobacterium, ya que hemos visto que al re-transferir un plásmido Sim, a partir de la transconjugante de Agrobacterium, a la cepa original de Rhizobium (curada de su plásmido Sim), el Rhizobium resultante es indistinguible de la cepa silvestre en cuanto a capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno (datos no presentados).

Dos cepas de R. phaseoli tipo II analizadas muestran pocas zonas de homología con diversas regiones de un plásmido simbiótico tipo I, aunque el patrón de bandas es similar entre las 2 cepas tipo II analizadas. En experimentos de hibridización en condiciones laxas, se ha visto que aumenta mucho el número de secuencias que hibridizan entre los plásmidos Sim tipo I y tipo II (M. Flores y R. Palacios, datos no publicados). Esto nos puede indicar que los dos tipos de plásmidos tienen un origen común, pero han divergido a través del tiempo.

Entre las cepas aisladas de nódulos de otras leguminosas, encontramos de 2 tipos: aquellas que presentan muy poca homología con la región nod-nif del plásmido simbiótico tipo I (CFN249, CFN400) y aquellas que presentan una homología intermedia (CFN 401, USDA191). En los dos tipos, clasificados en cuanto a comparación estructural, se encuentran cepas que son capaces de nodular efectiva (CFN249, CFN401) o ineffectivamente (CFN400, USDA 191) a Phaseolus vulgaris. Sería interesante hacer también una comparación estructural de los plásmidos de estas

cepas en condiciones más laxas, para tratar de determinar si el origen de estos plásmidos Sim también es el mismo que el de los Sim tipo I y II aislados de nódulos de P. vulgaris y si hay una correlación entre el origen de los plásmidos y su efectividad en Phaseolus vulgaris.

Los plásmidos simbióticos de cepas que nodulan P. vulgaris difieren en número de copias de genes nif y en rango de huéspedes para nodulación (Martínez et.al., 1985). Los datos presentados - en este trabajo muestran que los plásmidos difieren también en homología y localización de diversas secuencias analizadas y en la capacidad funcional que confieren a transconjugantes de - - Agrobacterium que los porten.

Entre las cepas aisladas originalmente de nódulos de P. vulgaris encontramos 2 tipos. Cepas con plásmidos tipo I tienen genes nif reiterados, rango estrecho de nodulación, confieren una actividad apenas detectable de fijación de nitrógeno a las transconjugantes y son estructuralmente parecidas entre ellas. Cepas con plásmidos tipo II tienen una copia única de genes nif, amplio rango de nodulación y confieren una actividad significativa de fijación de nitrógeno a las transconjugantes, además de ser estructuralmente poco homólogos a los plásmidos simbióticos tipo I. Los plásmidos simbióticos de cepas aisladas de otras leguminosas difieren entre ellos en su capacidad de nodulación efectiva de P. vulgaris, se semejan a los de cepas de tipo II en cuanto a que tienen una copia única de genes nif, pero difieren en el hecho de que sus transconjugantes de Agrobacterium

no son capaces de fijar nitrógeno. Estructuralmente éste no se puede considerar un grupo homogéneo, ya que algunas cepas se parecen más a las tipo I que otras.

En conclusión, estos datos indican que los genes necesarios para el establecimiento de una simbiosis efectiva con Phaseolus vulgaris se pueden encontrar en diferentes tipos de plásmidos. A su vez, estos plásmidos están contenidos en cepas de una gran diversidad genética cromosomal (D. Piñero et.al., 1988 en prensa). Será interesante analizar si los diferentes tipos de plásmidos simbióticos se complementan funcionalmente con algún tipo especial de cromosoma (y/o de otros plásmidos) para expresarse óptimamente o si son funcionalmente "promiscuos".

Recientemente se ha llevado a cabo un mapeo físico del plásmido Sim de la cepa tipo I CFN42 (M. Girard y Col., en preparación). Para correlacionar el mapeo estructural con un análisis funcional de este plásmido simbiótico, hemos iniciado un experimento de mutagénesis del plásmido Sim a través del aislamiento de múltiples inserciones del transposón Tn5. Hasta ahora hemos identificado 25 cepas que presentan algún fenotipo simbiótico de 270 inserciones obtenidas. Estamos en el proceso de localizar las inserciones en el mapa físico del plásmido simbiótico. Los resultados nos permitirán determinar que zonas del plásmido simbiótico están involucradas en el proceso de simbiosis.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, O.N., and Allen, E.K., The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. University of Wisconsin Press, USA., 1981.
- Appelbaum, E., Barkei, J., Kosslak, R., Thompson, D., and Maroney, M. Regulation of nodABC expression in Bradyrhizobium japonicum and Rhizobium japonicum. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Mexico, 1988.
- Appelbaum, E., Chartrain, N., Thompson, D., Johansen, K., O'Connell, M., and McLoughlin, T., Genes of Rhizobium japonicum involved in development of nodules, in Nitrogen Fixation Research Progress, Evans, H.J., Bottomley, P.J., Newton, W.E., eds. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1985, 101.
- Appelbaum, E.R., McLoughlin, R.J., O'Connell, M., Chartrain, N., Expression of symbiotic genes of Rhizobium japonicum USDA 191 in other rhizobia, J. Bacteriol, 163, 385, 1985.
- Ausubel, F.M., Regulation of nitrogen fixation genes, Cell, 37, 5, 1984.
- Ausubel, F., Albright, A., Gu, Q., Huala, E., Regulation of nitrogen fixation genes in R. meliloti, Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation, Cologne, F.R.G., 1988.

- Bachem, C.W.B., Banfalvi, Z., Kondorosi, E., Schell, J., and Kondorosi, A., Identification of host range determinants in the Rhizobium species MPIK3030, Mol. Gen. Genet. 203, 42, 1986.
- Bachem, C.W.B., Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Horvath, B., Kondorosi, A., and Schell, J., Identification and cloning of nodulation genes from the wide host range Rhizobium strain MPIK3030, Mol. Gen. Genet. 199, 271, 1985.
- Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I., Kondorosi, A., Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of R. meliloti, Mol. Gen. Genet., 184, 318, 1981.
- Batut, J., Boistard, P., Debelle, F., Denarie, J., Chai, J., Huguet, T., Infante, D., Martinez, E., Rosenberg, C., Developmental biology of the Rhizobium meliloti-alfalfa symbiosis: a joint genetic and cytological approach, in Nitrogen Fixation Research Progress, Evans, H.J., Bottomley, P.J., Newton, E.W., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1985, 109.
- Batut, J., Terzaghi, B., Gherardi, M., Huguet, M., Terzaghi, E., Garnerone, A.M., Boistard, P., and Huguet, T., Localization of a symbiotic fix region on Rhizobium meliloti pSym megaplasmid more than 200 kilobases from the nod-nif region. Mol. Gen. Genet., 199, 232, 1985.

- Batut, J., Boistard, P., Daveran, M.L., David, M., Garnerone, A.M., Kahn, D. and Li, R.Y., The regulatory pathway of nif and fix genes in R. meliloti. Proceeding of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Bauer, W.D., Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant. Physiol., 32, 407, 1981.
- Better, M., Ditta, G., and Helinski, D.R., Deletion analysis of Rhizobium meliloti symbiotic promoters, EMBO J., 4, 2419, 1985.
- Better, M., Lewis, B., Corbin, D., Ditta, G., and Helinski, D.R., Structural relationships among Rhizobium meliloti symbiotic promoters, Cell, 35, 479, 1983.
- Beynon, J.L., Beringer, J.E., and Johnston A.W.B., Plasmids and host-range in R. leguminosarum, J. Gen. Microbiol. 120, 413, 1980.
- Beynon, J.L., Beringer, J.E., Johnston, A.W.B., Plasmids and host-range in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium phaseoli, J. Gen. Microbiol., 120, 421, 1980.
- Birkenhead, K., Noonan, B., Manian, S.S., Wang, Y.P., and O'Gara, F., Characterization of R. meliloti dct genes and relationship between utilization of dicarboxylic acids and regulation of nitrogen fixation genes. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988a.

- Birkenhead, K., Manian, S.S. and O-Gara, F., Dicarboxylic acid transport in Bradyrhizobium japonicum: use of Rhizobium meliloti dct gene(s) to enhance nitrogen fixation. J. Bacteriol., 170, 184, 1988b.
- Borthakur, D., Downie, J.A., Johnston, A.W.B., and Lamb, J.W., psi, a plasmid-linked Rhizobium phaseoli gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation, Mol. Gen. Genet., 200, 278, 1985.
- Borthakur, D., Lamb, J.W., and Johnston, A.W.B., Analysis of three Rhizobium phaseoli genes, psi, psr and psa, which affect exopolysaccharide synthesis and symbiotic nitrogen fixation and/or nodulation, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 169.
- Brewin, N.J., Beringer, J.E., Buchanan-Wollaston, A.V., Johnston, A.W.B., and Hirsch, P.R., Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in Rhizobium leguminosarum, J. Gen. Microbiol., 116, 261, 1980.
- Brink, B.A., Cava, J.R. and Noel, K.D., R. leguminosarum lipopolysaccharide genetics and role in clover and bean nodulation, Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, - - México, 1988.

- Buchanan-Wollaston, B., Cannon, M.C., Beynon, J.L., and Cannon, F.C., Role of the nifA gene product in the regulation of nif expression in Klebsiella pneumoniae, Nature (London) 294, 776, 1981.
- Buikema, W.J., Klinsgensmith, J.A., Gibbons, S.L., and Ausubel, F.M., Conservation of structure and location of Rhizobium meliloti and Klebsiella pneumoniae nifB genes, J. Bacteriol., 169, 1120, 1987.
- Catteau, M., Khanaka, H., Legrand, M.D., and Gillaume, J., Contribution to the study of Rhizobium and Agrobacterium genes: numerical taxonomy, Veeger, C., and Newton W.E., (Eds.), Advances in nitrogen fixation research, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands, 1984, 330.
- Corbin, D., Barran, L., and Ditta, G., Organization and expression of Rhizobium meliloti nitrogen fixation genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 3005, 1983.
- Corbin, D., Ditta, G., and Helinski, D.R., Clustering of nitrogen fixation (nif) genes in Rhizobium meliloti, J. Bacteriol., 149, 221, 1982.
- Chandler, M.R., Some observations on infection of Arachis hypogaea L. by Rhizobium, J. Exp. Bot., 29, 749, 1978.
- Christensen, A.H., and Schubert, K.R., Identification of a Rhizobium trifolii plasmid coding for nitrogen fixation and nodulation genes and its interaction with pJB5JI, a Rhizobium leguminosarum plasmid, J. Bacteriol., 156, 592, 1983.

- David, M., Domergue, O., Pognonec, P. and Kahn, D., Transcription patterns fo R. meliloti symbiotic plasmid pSym:Identification of nifA independent fix genes, J. of Bacteriol., 169, 2239, 1987.
- De Bruijn, F.J., Pawlowski, K., Ratet, P., Hilgert, U., Wong, C.H., Schneider, M., Meyer, H., and Schell, J., - Molecular genetics of nitrogen fixation by Azorhizobium caulinodans ORS 571, the diazotrophic, stem nodulating symbiont of Sesbania rostrata. Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation, Cologne, F.R.G., 1988.
- Debelle, F., Rosenberg, C., Vase, J., Maillet, F., Martinez, E., Denarié, J., and Truchet, G., Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of Rhizobium meliloti, J. Bacteriol., 168, 1075, 1986.
- Diebold, R. and Noel, K.D., R. leguminosarum exopolysaccharide genetics and biovar dependent role in symbiosis, Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A. and Kim C.H., The nifA gene of Rhizobium meliloti is oxygen regulated, J. of Bacteriol., 169, 3217, 1987.
- Dixon, R., The genetic complexity of nitrogen fixation. The ninth Fleming lecture, J. Gen. Microbiol., 130, 2745, 1984.

- Dylan, T., Ielpi, L., Ditta, G., and Helinski, D., Non-invasive R. meliloti mutants ndvA and ndvB are deficient in $\beta(1\rightarrow2)$ glucan production and altered in their osmotolerance. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D.R., and Ditta, G., Rhizobium meliloti genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in Agrobacterium tumefaciens. Proc. Natl., Acad. Sci. USA., 83, 4403, 1986.
- Djordjevic, M.A., Schofield, P.R., Ridge, R.W., Morrison, N.A., Bassam, B.J., Plazinski, J., Watson, J.M., and Rolfe, B.G., Rhizobium nodulation genes involved in root hair curling (Hac) are functionally conserved, Plant Mol., Biol., 4, 147, 1985.
- Djordjevic, M.A., Zurkowski, W., and Rolfe B.G., Plasmids and stability of symbiotic properties of Rhizobium trifolii, J. Bacteriol., 151, 560, 1982.
- Djordjevic, M.A., Zurkowski, W., Shine, J., and Rolfe, B.G., Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of Rhizobium trifolii, R. leguminosarum and R. meliloti, J. Bacteriol., 156, 1035, 1983.
- Douglas, C.J., Staneloni, R.J., Rubin, R.A., and Nester, E.W., Identification and genetic analysis of an Agrobacterium tumefaciens chromosomal virulence region, J. Bacteriol., 161, 850, 1985.

- Downie, J.A., and Johnston, A.W.B., Nodulation of legumes by Rhizobium: the recognized root?, Cell, 47, 153, 1986.
- Downie, J.A., Knight, C.D., Johnston, A.W.B., and Rossen, L., Identification of genes and gene products involved in the nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum, Mol. Gen. Genet., 198, 225, 1985.
- Earl, C.D., Ronson, C.W., and Ausubel, F.M., Genetic and structural analysis of the Rhizobium meliloti fixA, fixB, fixC and fixX genes, J. Bacteriol., 169, 1127, 1987.
- Ebeling, S., Rossbach, S., Regensburger, B., Studer, D., and Hennecke, H., Identification and cloning of two separate DNA regions of B. japonicum involved in nodule development and nitrogen fixation. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Egelhoff, T.T., Fisher, R.F., Jacobs, T.W., Mulligan, J.T., and Long, S.R., Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti 1021 nodulation genes: nodD is read divergently from nodABC, DNA, 4, 241, 1985.
- Elkan, G.H., Taxonomy and metabolism of Rhizobium and its genetic relationships in Biological Nitrogen Fixation, Alexander M. Ed. Plenum Press, 1984.
- Elmerich, C., Haumard, J., Sibold, L., Manheimer, I., and Charpin, N., Genetic and biochemical analysis of mutants induced by bacteriophage Mu integration into K. pneumoniae nitrogen fixation genes, Mol. Gen. Genet., 165, 181, 1978.

- Fischer, H.M., Alvarez-Morales, A., and Hennecke, H., 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, 1986.
- Fisher, R.F., Tu, J.K., and Long, S.R., Conserved nodulation genes in Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii, Appl. Environ. Microbiol., 49, 1432, 1985.
- Flores, M., González, V., Brom, S., Martínez, E., Piñero, D., Dávila, G., and Palacios, R., Reiterated DNA sequence in Rhizobium and Agrobacterium spp., J. Bacteriol., 169, 5782, 1987.
- Flores, M., González, V., Pardo, M.A., Leija, A., Martínez, E., Romero, D., Piñero, D., Dávila, G. and Palacios, R., Genomic instability in Rhizobium phaseoli, J. Bacteriol., 170, 1191, 1988.
- Fuhrmann, M., Fischer, H.M., and Hennecke, H., Mapping of Rhizobium japonicum nifB, fixBC and fixA-like genes and identification of the fixA promoter, Mol. Gen. Genet., 199, 315, 1985.
- Gibbins, A.M., and Gregory, F.K., Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species determined by three methods of nucleic acid hybridization, J. Bacteriol., 111, 129, 1972.

- Girard, M.L., Brom, S., Flores, M., Romero, D., Palacios, R., and Dávila, G., Structural and functional organization of R. phaseoli type I symbiotic plasmid. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Graham, P.H., The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes, J. Gen. Microbiol., 35, 511, 1964.
- Gray, J., Batley, M., Chen, H., Redmond, J., Arioli, T., -- Djordjevic, S., Djordjevic, M., and Rolfe, B., Regulation of exopolysaccharide synthesis in Rhizobium strain NGR234. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Gottfert, M., Horvath, B., Kondorosi, E., Putnoky, P., Rodriguez-Quiriones, F., and Kondorosi, A., At least two nodD genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti, J. Mol., Biol., 191, 411, 1986.
- Gubler, M., and Hennecke, H., FixA, B and C genes are essential for symbiotic and free-living microaerobic nitrogen fixation, FEBS Lett., 200, 186, 1986.
- Gubler, M., and Hennecke, H., Bradyrhizobium japonicum fixA, B and C genes are essential for symbiotic and free-living, microaerobic N fixation in Proc. Third Int. Sym. Molecular-Genetics of Plant Microbe Interactions, Montreal, Canada, 1986, 204.

- Hennecke, H., and Fischer, H.M., Genetics of symbiotic nitrogen fixation in B. japonicum: regulation of nif and fix genes and identification of genes involved in bacteroid electron transport. Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation, Cologne, F.R.G., 1988.
- Hennecke, H., Fisher, H.M., Ebeling, S., Gubler, M., Thony, B., Gottfert, M., Lamb, J., Hahn, M., Ramseier, T., - - Regensburger, B., Alvarez-Morales, A., and Studer, D., Nif, Fix and Nod gene cluster in Bradyrhizobium japonicum and nifA-mediated control of symbiotic nitrogen fixation, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S. and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 191.
- Higashi, S., Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor, J. Gen. Appl. Microbiol., 13, 391, 1967.
- Hollis, A.B., Kloos, W.E., and Elkan, G.H., DNA:DNA hybridization studies of Rhizobium japonicum and related Rhizobiaceae, J. Gen. Microbiol., 123, 215, 1981.
- Holsters, M., Van Den Eede, G., Goethals, K., van Montagu, M. and Dreyfus, B., Nodulation genes of the stem nodulating Sesbania rostrata symbiont, strain ORS571, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S. and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 208.

- Honma, M.A., Asonmaning, M. and Ausubel, F.M., Multiple copies of the nodD gene in R. meliloti. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of the Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Honma, M.A. and Ausubel, F.M., Host specific nodulation: effects of multiple nodD genes of Rhizobium meliloti, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S. and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 223.
- Honma, M.A. and Ausubel, F.M., Rhizobium meliloti has three functional copies of the nodD symbiotic regulatory gene. Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 8558, 1987.
- Hontelez, J., Lankhorst, R.K., Jansma, J.D., Jacobson, E., van den Bos., R.C. and van Kammen, A., Characterization of symbiotic genes and regulation of their expression in Rhizobium leguminosarum pre. in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S. and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 241.
- Hooykaas, P.J.J., van Brussel, A.A.N., den Dulk, Ras, H., van Slogteren, G.M.S. and Schilperoot, R.A., Sym plasmid of Rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and Agrobacterium tumefaciens, Nature (London), 291, 351, 1981.

- Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Torok, I., Gyorgypal, Z., Barabas, I., Wieneke, U., Schell, J. and Kondorosi, A., Organization, structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa, *Cell*, 46, 335, 1986.
- Huala, E. and Ausubel, F., Post-transcriptional regulation of R. meliloti nifA by oxygen. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Hynes, M.F., Quandt, J., O'Connell, M.P., Brucksch, K. and Priefer, V., Identifying genes on cryptic plasmids in strains of R. leguminosarum biovar viceae. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Hynes, M.F., Simon, R., Muller, P., Niehaus, K., Labes, M. and Puhler, A., The two megaplasmids of Rhizobium meliloti are involved in the effective nodulation of alfalfa, *Mol. Gen. Genet.*, 202, 365, 1986.
- Innes, R., Djordjevic, M., Rolfe, B., Denarie, J. and Kuempel, P., Interactions between Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii nodulation genes: what is the basis for dominance by R. meliloti?, in *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Verma, D.P.S. and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 229.

- Innes, R.W., Kuempel, P.L., Pazinski, J., Canter-Cremers, H., Rolfe, B.G. and Djordjevic, M.A., Plant factors induce expression of nodulation and host range genes in Rhizobium trifolii, Mol. Gen. Genet., 201, 426, 1985.
- Jacobs, T.W., Egelhoff, T.T. and Long, S.R., Physical and genetic map of a Rhizobium meliloti nodulation gene region and nucleotide sequence of nodC, J. Bacteriol., 162, 469, 1985.
- Jarvis, B.D.W., Dick, A.G., and Greenwood, R.M., Deoxyribonucleic acid homology among strains of Rhizobium trifolii and related species, Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 42, 1980.
- Jarvis, B.D.W., Gillis, M., and de Ley, J., Intra-and inter-generic similarities between 23S ribosomal RNA cistrons from Rhizobium and related bacteria, in Nitrogen Fixation Research Progress, Evans, H.J., Bottomley, P.J., and Newton, W.E., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1985, 149.
- John, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schell, J., Expression of the nodulation gene nodC of Rhizobium meliloti in Escherichia coli: role of the nodC gene product in nodulation, EMBO J., 4, 2425, 1985.
- Johnston, A.W.B., Beynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V., Setchell, S.M., Hirsch, P.R., and Beringer, J.E., High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium, Nature (London), 276, 634, 1978.

- Jordan, D.C., Rhizobiaceae in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed., Kreig, N.R., and Holt, J.C., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore, 234, 1984.
- Kahn, D., Batut, J., Boistard, P., Daveran, M.L., David, M., Domergue, O., Garnerone, A.M., Chai, J., Hertig, C., Infante, D., and Renalier, M.H., Molecular analysis of a Fix cluster from Rhizobium meliloti, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 258.
- Kahn, D., David, M., Batut, J., Daveran, M.L., Garnerone, A.M., Paques, F., Li Rouo, Y., and Boistard, P., Cascade activation of nif genes in R. meliloti. Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation, Cologne, F.R.G., 1988.
- Kaluza, K., Fuhrmann, M., Hahn, M., Regensberger, B., and Hennecke, H., In Rhizobium japonicum the nitrogenase genes nifH and nifKD are separated, J. Bacteriol., 155, 915, 1983.
- Kaminshi, A.P., Desnoues, N., Arigoni, F. and Elmerich, C., Characterization of the fixABC region of Azorhizobium caulinodans ORS571 and identification of a new nitrogen fixation gene. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.

- Knight, C.D., Rossen, L., Robertson, J.G., Wells, B., and Downie, J.A., Nodulation inhibition by Rhizobium leguminosarum multicopy nodABC genes and analysis of early stages of plant infection, *J. Bacteriol.*, 166, 552, 1986.
- Kondorosi, E., Banfalvi, Z., and Kondorosi, A., Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti: identification of nodulation genes, *Mol. Gen. Genet.*, 193, 445, 1984.
- Kondorosi, A., Kondorosi, E., Horvath, B., Gottfert, M., Bachem, C., Rodriguez-Quir6nes, F., Banfalvi, Z., Putnoki, P., Gyorgypal, Z., John, M., Schmidt, J., and Schell, J., Common and host specific nodulation genes in Rhizobium meliloti and their conservation in other rhizobia, in *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 217.
- Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C.E., Broughton, W.J., and Banfalvi, Z., Mobilization of a Rhizobium meliloti megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other Rhizobia and Agrobacterium, *Mol. Gen. Genet.*, 188, 433, 1982.
- Lamb, J.W., and Hennecke, H., In Bradyrhizobium japonicum the common nodulation genes, nodABC, are linked to nifA and fixA, *Mol. Gen. Genet.*, 202, 512, 1986.

- Lamb, J.W., Hombrecher, G., and Johnston, A.W.B., Plasmid-determined nodulation and nitrogen fixation abilities in Rhizobium phaseoli, Mol. Gen. Genet., 186, 449, 1982.
- Leigh, J.A., Symbiotic mutants of Rhizobium meliloti which produce non-succinylated exopolisaccharide, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 165.
- Leigh, J.A., Signer, E.R., and Walker, G.C., Exopolysaccharide deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 6231, 1985.
- Le Strange, K., Batley, M., Redmond, J., Bender, G., Lewis, W., Rolfe, B., and Nayudu, M., Plant signals for nodulation by Rhizobium: broad and narrow host-range strategies. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Long, S.R., Buikema, W.J., and Ausubel, F.M., Cloning of Rhizobium meliloti nodulation genes by direct complementation of nod mutants, Nature (London), 298, 485, 1982.
- Lorocho, V.A., Stein, P.A., Nees, D.W., and Ludwig, R.A., Transcriptional and post-transcriptional regulation of nifA gene expression in Azorhizobium caulinodans ORS571. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.

- MacNeil, T., MacNeil, D., Roberts, G.P., Supiano, M.A., and Brill, W.J., Fine structure and complementation analysis of nif genes in Klebsiella pneumoniae, J. Bacteriol., 136, 253, 1978.
- Martinez, E., and Palacios, R., Is it necessary to improve nitrogen fixation of bean in agricultural fields in México? In Advances in Nitrogen Fixation Research, Veeger, C., and Newton, W.E., Eds., The Hague and Wageningen: Nijhoff, Junk and Pudoc, 1984.
- Martinez, E., Palacios, R., and Sánchez, F., Nitrogen-fixing nodules induced by A. tumefaciens harboring R. phaseoli plasmids, J. Bacteriol., 169, 2828, 1987.
- Martinez, E., Pardo, M.A., Palacios, R., and Cevallos, M.A., Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in E. vulgaris, J. Gen. Microbiol., 131, 1779, 1985.
- Martinez, E., Romero, D., and Palacios, R., The Rhizobium genome, CRC critical Reviews in Plant Sciences, aceptado para su publicación, 1988.
- Marvel, D.J., Torrey, J.G., and Ausubel, F.M., Rhizobium-symbiotic genes required for nodulation of legume and non-legume hosts, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 1319, 1987.
- Merrick, M., Organization and regulation of nitrogen fixation genes in Klebsiella and Azotobacter, Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation, Cologne, F.R.G., 1988.

- Merrick, M., Filser, M., Kennedy, C., and Dixon, R., Polarity of mutations induced by insertion of transposon Tn5, Tn7 and Tn10 into the nif gene cluster of K. pneumoniae, Mol. Gen. Genet., 165, 103, 1978.
- Moffett, M.L., and Colwell, R.R., Adansonian analysis of the Rhizobiaceae, J. Gen. Microbiol., 51, 245, 1968.
- Mulligan, J.T., and Long, S.R., Induction of Rhizobium meliloti nodC expression by plant exudate requires nodD, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 6609, 1985.
- Murphy, P.J., Trenz, S., Heycke, N. and Schell, J., A rhizopine in the Rhizobium-alfalfa symbiosis, Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Nayudu, M., Bender, G.L., Lewis, W., and Rolfe, B.G., Broad host-range Rhizobium nodD regulatory gene, key element of nodulation host specificity and non-legume host-specific interaction. Proceedings, of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Nixon, B.T., Ronson, C.W., and Ausubel, F.M., Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 7850, 1986.

- Noel, K.D., Van den Bosch, K.A., and Kulpaca, B., Mutations in Rhizobium phaseoli that lead to arrested development of infection threads, *J. Bacteriol.*, 168, 1392, 1986.
- Olivares, J., and Sanjuan, J., Studies on the non-symbiotic plasmid of R. meliloti. Proceedings, of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Palomares, A.J., Coronado, C., Sousa, C., Vargas, C., Berraguero, F.R. and Megias, M., Study of ndv genes in R. trifolii and other Rhizobium species, Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Piñero, D., Martínez, E., and Selander, K., Genetic diversity and relationships among isolates of R. leguminosarum biovar phaseoli, *Appl. Environ. Microbiol.*, en prensa, 1988.
- Putnoky, P., and Kondorosí, A., Two gene clusters of Rhizobium meliloti code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency. *J. Bacteriol.*, 167, 881, 1986.
- Priefer, U.B., Schmidt, C., Presiler, S., Kapp, D., and Puhler, A., R. leguminosarum cell surface mutants affected in their symbiotic ability. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.

- Quinto, C., Cevallos, M.A., Peralta, Y., Espin, G., and Dávalos, A., A 34 Kb cosmid induces nodule information in a R. phaseoli Sym cured strain. Proceedings of the 6th International Symposium on Nitrogen Fixation. Evan, H.J., Bottomley, P.J., Newton, W.E., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, 1985.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., Girard, M.L., Calva, E., and Palacios, R., Nitrogenase reductase: a functional multigene family in Rhizobium phaseoli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 1170, 1985.
- Quinto, C., Martinez, J., Cevallos, M.A., Dávalos, A., and Peralta, Y., Genomic organization of nodulation genes in Rhizobium phaseoli, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 214.
- Ramakrishnan, N., Prakash, R.K., Shantharam, S., Duteau, N.M., and Atherly, A.G., Molecular cloning and expression of Rhizobium fredii USDA 193 nodulation genes: extension of host range for nodulation, J. Bacteriol., 168, 1087, 1986.
- Renalier, M.H., Batut, J., Ghai, J., Terzaghi, B., Gherardi, M., David, M., Garnerone, A.M., Vasse, J., Truchet, G., Huguet, T., and Boistard, P., A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of Rhizobium meliloti 2011 carries a functional fix gene repeat and a nod locus. J. of Bacteriol., 169, 2231, 1987.

- Roberts, G.P., and Brill, W.J., Gene product relationship of the nif regulon of Klebsiella pneumoniae, J. Bacteriol., 144, 210, 1980.
- Roberts, G., Leps, W.T., Silver, L.E., and Brill, W.J., Use of dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify Rhizobium strains, Appl. Environ. Microbiol., 39, 414, 1980.
- Robertson, J.G., Wells, B., Brewin, N.J., Wood, E., Knight, C.D., and Downie, J.A., The legume-Rhizobium symbiosis: a cell surface interaction, J. Cell Sci. Suppl., 2, 317, 1985.
- Rodriguez-Quir6nes, F., Banfalvi, Z., Murphy, P., and Kondorosi, A., Interspecies homology of nodulation genes in Rhizobium, Plant Mol. Biol., 8, 61, 1987.
- Rolfe, B.G., Redmond, J.W., Batley, M., Chen, H., Djordjevic, S.P., Ridge, R.W., Bassam, B.J., Sargent, C.L., Dazzo, F.B., and Djordjevic, M.A., Intercellular communication and recognition in the Rhizobium-legume symbiosis, in Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions, Vol. H4, Lugtenberg, B. Ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1986, 39.
- Ronson, C.W., Nixon, B.T., and Ausubel, F.M., Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli, Cell, 49, 579, 1987.
- Ronson, C.W., Nixon, B.T., Albright, L.M. and Ausubel, J.M., Rhizobium meliloti nitrA (rpoN) gene is required for diverse metabolic functions, J. Bacteriol., 169, 2424, 1987.

- Rossen, L., Johnston, A.W.B. and Downie, J.A., DNA sequence of the Rhizobium leguminosarum nodulation genes nodAB and C required for root hair curling, Nucl. Acids. Res., 12, 9497, 1984.
- Rossen, L., Ma, Q.S., Mudd, E.A., Johnston, A.W.B., and Downie, J.A., Identification and DNA sequence of fixZ a nifB-like gene from Rhizobium leguminosarum, Nucl. Acids. Res., 12, 7123, 1984.
- Rossen, L., Sherman, C.A., Johnston, A.W.B., and Downie, J.A., The nodD gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the nodA, B, C genes, EMBO J., 4, 3369, 1985.
- Rostas, K., Sista, P.R., Stanley, J., and Verma, D.P.S., Transposon mutagenesis of Rhizobium japonicum, Mol. Gen. Genet., 197, 230, 1984.
- Russell, P., Schell, M.G., Nelson, K.K., Halverson, L.J., Sirotkin, K.M., and Stacey, G., Isolation and characterization of the DNA region encoding nodulation functions in Bradyrhizobium japonicum, J. Bacteriol., 164, 1301, 1985.
- Ruvkun, G.B., Sundaresan, B., and Ausubel, F.M., Direct transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of Rhizobium meliloti symbiotic nitrogen fixation genes, Cell, 29, 551, 1982.
- Sadowsky, M.J., and Bohloul, B.B., Differential expression of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in genetically - - dissimilar backgrounds, Symbiosis, 1, 125, 1985.

- Shearman, C.A., Rossen, L., Johnston, A.W.B., and Downie, J.A., The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nodF encodes a polypeptide similar to acyl-carrier and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate, EMBO J., 5, 647, 1986.
- Schetgens, R., Hontelez, J., Van den Bos, R., and Kammen, A., Identification and phenotypical characterization of a cluster of fix genes, including a nif regulatory gene, from Rhizobium leguminosarum PRE., Mol. Gen. Genet., 200, 368, 1985.
- Schofield, P.R., Ridge, R.W., Rolfe, B.G., Shine, J., and Watson, J.M., Host specific nodulation is encoded on a 14 Kb fragment in Rhizobium trifolii, Plant Mol., Biol., 3, 3, 1984.
- Schofield, P.R., and Watson, J.M., DNA sequence of Rhizobium trifolii nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence proceeding nodABC and nodFE, Nucl. Acids. Res., 14, 2891, 1986.
- Scott, K.F., Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont Bradyrhizobium sp. (Parasponia), Nucl. Acids. Res., 14, 2905, 1986.
- Scott, K.F., Hughes, J.E., Gresshoff, P.M., Beringer, J.E., Rolfe, B.G., and Shine, J., Molecular cloning of Rhizobium trifolii genes involved in symbiotic nitrogen fixation, J. Mol. Appl. Genet., 1, 315, 1982.

- Scott, B., McDonald, P., Young, C., and Pankhurst, C., R. loti host-specific nodulation genes. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Scott, K.F., Rolfe, B.G., and Shine, J., Nitrogenase structural genes are unlinked in the nonlegume symbiont Parasponia Rhizobium, DNA, 2, 141, 1983.
- Scott, D.B., and Ronson, C.W., Identification and mobilization by cointegrate formation of a nodulation plasmid in Rhizobium trifolii, J. Bacteriol., 151, 36, 1982.
- Segovia, L., Construcción de mutaciones en las regiones nif de R. phaseoli. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica, U.N.A.M., 1988.
- Simon, R., High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-mob transposon, Mol. Gen. Genet., 196, 413, 1984.
- So, J.S., Hodgson, A.L.M., Haugland, R., Leavitt, M., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A.J., and Stacey, G., Transposon-induced symbiotic mutants of Bradyrhizobium japonicum: isolation of two genes regions essential for nodulation, Mol. Gen. Genet., 207, 15, 1987.
- Spaink, K.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., and Lugtenberg, B., The constitutive and plant root exudate-inducible promoters of the nodulation region of the Rhizobium leguminosarum sym plasmid pRL1JI, Plant Mol., Biol., - - 9, 27, 1987.

- Spaink, K., Okker, R., Wijffelman, C. and Lugtemberg, B., Fine mapping of properties of the Rhizobium nodD gene by means of hybrid nodD molecules. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Stacey, G., Nieuwkoop, A.J., Banfalvi, Z., So, J.S., Deshmone, N., Schell, M.G., and Gerhold, D., Molecular genetics of nodulation of soybean by Bradyrhizobium japonicum, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 197.
- Stanfield, S.W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D., and Ditta, G., The ndvA gene product in R. meliloti is required for $\beta(1 \rightarrow 2)$ glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
- Szeto, W., and Cannon, F., An ntrC homologue in B. japonicum, in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987a, 250.
- Szeto, W.W., Nixon, B.T., Ronson, C.W., and Ausubel, F.M., Identification and characterization of the Rhizobium meliloti ntrC gene: R. meliloti has separate regulatory pathways for activating nitrogen fixation genes in free-living versus symbiotic cells, J. Bacteriol., 169, 1423,

- 1987b.
- Szeto, W.W., Zimmerman, J.L., Sundaresan, V., and Ausubel, F.M., A Rhizobium meliloti symbiotic regulatory gene, *Cell*, 36, 1035, 1984.
 - Toro, N., and Olivares, J., Analysis of Rhizobium meliloti sym mutants obtained by heat treatment, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1148, 1986.
 - Torok, I., and Kondorosi, A., Nucleotide sequence of the R. meliloti nitrogenase reductase (nifH) gene, *Nucl. Acids. Res.*, 9, 5711, 1981.
 - Torok, I., Kondorosi, E., Stepkowski, T., Posfai, J., and Kondorosi, A., Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti nodulation genes, *Nucl. Acids. Res.*, 24, 9509, 1984.
 - Truchet, G., Debelle, F., Vasse, J., Terzaghi, B., Garnerone, A.M., Rosenberg, Ch., Batut, J., Maillet, F., and Denarié, J., Identification of Rhizobium meliloti pSym2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation, *J. Bacteriol.*, 164, 1200, 1985.
 - Truchet, G., Rosenberg, C., Vasse, J., Julliot, J.S., and Denarié, J., Transfer of R. meliloti pSym genes into Agrobacterium tumefaciens: host specific nodulation by atypical infection, *J. Bacteriol.*, 157, 134, 1984.
 - Van, Brussel, A.A.N., Tak, T., Wetselaar, A., Pees, E., and Wijffelman, C.A., Small leguminosae as test plants for nodulation of R. leguminosarum and other rhizobia and agrobacteria harboring a leguminosarum Sym plasmid, *Plant*

- Sci. Lett., 27, 317, 1982.
- Van den Bosch, K.A., Noel, K.D., Kaneko, Y., and Newcomb, E.H., Nodule initiation elicited by noninefective mutants of Rhizobium phaseoli, J. Bacteriol., 162, 950, 1986.
 - Vanstockem, M., Michiels, K., Maris, M., Vanderleyden, J., and Van Gool, A.P., Developments in the genetic analysis of Azospirillum. Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Verma, D.P.S., and Brisson, N., Eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1987, 313.
 - Vieille, C., Onyeocha, I., Baca, B.E., and Elmerich, C., Genetic analysis of a 90MD plasmid of Azospirillum brasilense SP7. Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.
 - Wang, C.L., Beringer, J.E., and Hirsch, P.R., Host plant effect on hybrids of Rhizobium leguminosarum biovar viciae and trifolii, J. Gen. Microbiol., 132, 2063, 1986.
 - Wedlock, D.N., and Jarvis, B.D.W., The genetic relationship between Rhizobium fredii, Galega rhizobia and other Rhizobium and Bradyrhizobium species, in Nitrogen Fixation Research Progress, Evans, H.J., Bottomley, P.J., and Newton, E.W., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1985, 154.
 - Williams, M.N.V., Klein, S., and Signer, E.R., Suppression of exo mutants in R. meliloti, Proceedings of the 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, México, 1988.

- Zimmerman, J.L., Szeto, W.W., Ausubel, F.M., Molecular characterization of Tn5-induced symbiotic (fix) mutants of Rhizobium meliloti, J. Bacteriol., 156, 1025, 1983.

TABLA 1

| Cepa | Aislada de: | Nodulación | | | | Fijación de Nitrógeno en <i>P. vulgaris</i> ^(c) | | Homología ^(d) | | |
|---------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------|--|----------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | <i>P. vulgaris</i> | | <i>L. leucocephala</i> | | <i>R</i> | <i>T</i> | pSM991 ^(e) | pMF101 ^(f) | pMF4 ^(g) |
| | | <i>R</i> ^(a) | <i>T</i> ^(b) | <i>R</i> | <i>T</i> | | | | | |
| CFN42 | <i>P. vulgaris</i> | + | + | - | - | + | + | ++++ | ++++ | ++++ |
| CFN285 | <i>P. vulgaris</i> | + | + | - | - | + | + | ++++ | ++++ | +++ |
| CFN299 | <i>P. vulgaris</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| CIAT899 | <i>P. vulgaris</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| CFN249 | <i>Dalea leporina</i> | + | + | + | + | + | - | + | ND | ND |
| CFN400 | <i>Clitoria ternatea</i> | + | + | + | + | - | - | + | ND | ND |
| CFN401 | <i>Pachyrhizus erosus</i> | + | + | - | - | + | - | ++ | ND | ND |
| USDA191 | <i>Glycine max</i> | + | + | + | - | - | - | ++ | ND | ND |

a) Cepa de *Rhizobium*

b) Transconjugante de *Agrobacterium* con pSim correspondiente

c) Determinada como reducción de acetileno: + (nivel alto), + (10-20% del *Rhizobium* respectivo), + (apenas detectable), - (no detectable)

d) Hibridizaciones realizadas en condiciones de alta severidad: ++++: bandas similares en cantidad e intensidad
 +++: bandas con igual intensidad, diferente localización
 ++: gran intensidad, diferente localización, menor número de bandas
 +: pocas bandas de baja intensidad
 -: no hay hibridización
 ND: no determinado

e) Región *nod-nif* de pSim de CFN42 (Quinto et.al., 1985)

f) Secuencia reiterada de pSim de CFN42 (Flores et.al., 1987)

g) Secuencia única de pSim de CFN42 (Flores et.al., 1987)

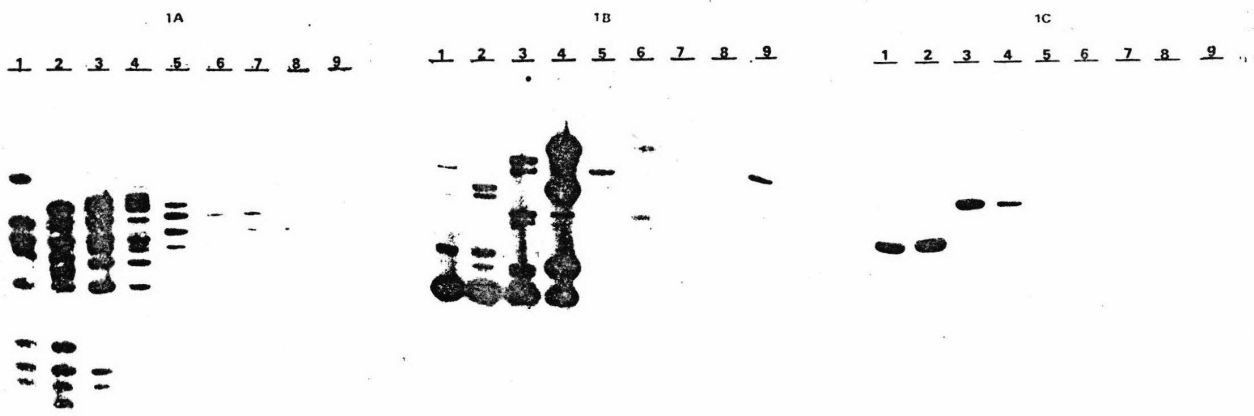


FIGURA 1

Hibridización en condiciones de alta estringencia (Flores et.al.1987) de DNA de diferentes cepas de Rhizobium y sus respectivas transconjugantes de Agrobacterium. Carriles: 1:GMI9023/pCFN42d, 2:CFN42, 3:GMI/pCFN285b, 4:CFN285, 5:GMI9023/pCFN299a,b, 6:CFN299, 7:GMI9023/pCIAT899b, 8:CIAT899, 9:GMI9023. Detectores; 1A:cos991 (Quinto et.al.,1985), 1B:PMF101 1C: pmf4 (Flores et.al., 1987). Los DNAs se digirieron con la enzima de restricción EcoR1.

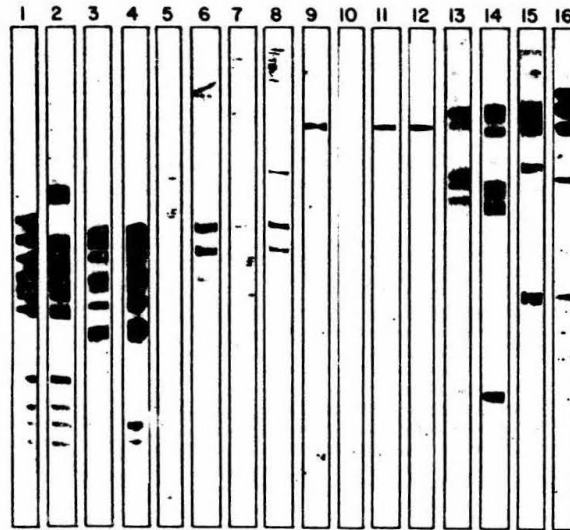


FIGURA 2

Hibridización de DNA de diferentes cepas de Rhizobium y transconjugantes de Azospacterium con el pSM991 que contiene la región nif-nod del plásmido simbiótico de la cepa tipo I CFN42.
 Carriles: 1:CFN42. 2:GMI9023/pCFN42d. 3:CFN285. 4:GMI9023/pCFN285b. 5:CFN299. 6:GMI9023/pCFN299a,b. 7:CIAT899. 8:GMI9023/pCIAT899b. 9:CFN149. 10:GMI9023/pCFN149a. 11:CFN400. 12:GMI9023/pCFN400a. 13:CFN401. 14:GMI9023/pCFN401a. 15:USDA191. 16:GMI9023/pUSDA191b.