

03062
15
2 y

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSTGRADO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

UNIDAD DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA VEGETAL

IDENTIFICACION Y CLONACION DE DETERMINANTES DE ESPECIFICIDAD DE
LA CEPA DE AMPLIO ESPECTRO DE HOSPEDERO Rhizobium leguminosarum
bv. phaseoli CIAT 899.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA, PRESENTA :

LUIS JAVIER MARTINEZ MORALES.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O .

- I.- RESUMEN**
- II.- INTRODUCCION**
- III.- OBJETIVO**
- IV.- MATERIAL Y METODOS**
- V.- ESTRATEGIA**
- VI.- RESULTADOS**
- VII.- DISCUSION**
- VIII.- CONCLUSION**
- IX.- BIBLIOGRAFIA**

I.- RESUMEN

Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli se ha clasificado en dos tipos de cepas: las tipo I que presentan entre otras características, espectro estrecho de hospedero (sólo nodula frijol) y las tipo II que tienen la capacidad de nodular un amplio espectro de hospederos, ya que además de nodular frijol (Paseolus vulgaris), nodula huaje (Leucaena esculenta y Leucaena leucocephala) y siratro (Macroptilium atropurpureum). En este trabajo se identificó y caracterizó un fragmento de DNA de la cepa CIAT 899 perteneciente al tipo II el cual al ser introducido en la cepa CE-3 (tipo I), le proporciona la capacidad de nodular Leucaena y Macroptilium. Este segmento de 6.5 Kb. pertenece al plásmido simbiótico (pSym) de la cepa CIAT 899 y porta los posibles genes nod ABC y nod D. Una mutación en este fragmento, por inserción del transposon mini Mu lac provoca la pérdida del fenotipo de nodulación en Leucaena de la cepa CE-3.

II.- INTRODUCCION

Dentro de la familia Rhizobiaceae, existen cuatro géneros de bacterias que interaccionan con plantas, estos son: Rhizobium, Bradyrhizobium, Phylobacterium, y Agrobacterium. Las especies de Rhizobium se han clasificado en tres grupos: Grupo 1 que contiene tres especies, Rhizobium meliloti, Rhizobium fredii, y Rhizobium leguminosarum con tres biovares: trifoli, viciae, y phaseoli, éste último con dos tipos de cepas: tipo I con los genes de la nitrogenasa reiterados y estrecho espectro de hospedero, y tipo II con los genes de la nitrogenasa no reiterados y amplio espectro de hospedero. Grupo 2 que contiene a Rhizobium loti. Grupo 3 que contiene a especies de Bradyrhizobium, y "Rhizobia Galega" (44).

Rhizobium es una bacteria del suelo capaz de vivir libremente y de establecer una simbiosis más o menos específica con algunas plantas leguminosas, por lo que se les asignó un nombre de especie de acuerdo a la planta que infectaban. Sin embargo, existen algunos casos donde la especificidad de infección, no es estricta, ya que no todas infectan y nodulan una sola especie de planta (20).

La interacción natural entre las bacterias del género Rhizobium y las plantas leguminosas, culmina en la mayoría de los casos, en la formación de nódulos, donde ocurre la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, que es convertido a amonio, el cual es asimilado por la planta (72). Al ponerse en contacto Rhizobium con la planta leguminosa, la bacteria coloniza rápidamente gran parte de la raíz (26), pero solo al-

gunas raicillas son susceptibles de infección por tiempos muy cortos (9). Al emerger los pelos radiculares, provocan que la raíz secrete compuestos (flavonas, etc.) capaces de activar genes bacterianos, y como respuesta, la bacteria excreta compuestos capaces de causar deformaciones muy pronunciadas en los pelos radiculares (8). En otros casos, estos compuestos provocan fenómenos internos en la planta, como la división celular del cortex de la raíz (6). La unión de las bacterias a las células de los pelos radiculares, en algunos casos es mediada por lectinas de origen vegetal (19); después del reconocimiento, la pared del pelo es degradado por las bacterias (55), y el núcleo de la célula vegetal, se desplaza hacia el lugar de la infección, (se desconoce el motivo) (18). Posteriormente, se forma el hilo de infección por acumulación de algunos compuestos, que son aportados por la planta (34), las bacterias se dividen en éste hilo de infección, el cual empieza a penetrar las capas celulares, al pasar por la corteza externa, induce a distancia, una nueva división meristemática de la corteza interna (10), quedando algunas células poliploides, y es entonces, cuando la planta libera factores sistémicos, que impiden la formación de nódulos en exceso (52). El avance del hilo, se detiene al encuentro con una célula vegetal poliploide, liberando en ésta su contenido de bacteroides; éstos carecen de pared, pero están envueltos por la membrana peribacteroidal, de origen vegetal (56). En este estado de bacteróide son capaces de fijar nitrógeno. Durante la diferenciación del tejido vegetal, para concluir la formación del nódulo, se inducen de manera importante algunas proteínas

específicas de este estadio, que se les ha denominado nodulinas (37,11,35,17), éstas se han clasificado en: tempranas y tardías. Las tempranas se inducen antes de la fijación de nitrógeno, incluso antes de la infección (en algunos casos). Las tardías aparecen concomitantemente con la fijación de nitrógeno. Se han descrito un número aproximado de veinte, sin embargo muy pocas se han caracterizado, entre las más estudiadas se encuentran, la leghemoglobina como una de las proteínas mayoritarias (70), el péptido gama de la glutamino sintetasa (36), la uricasa II, (7,59) y de las más recientemente descritas, la sacarosa sintetasa (68) y la familia N30 (17). La morfología de los nódulos varía de acuerdo a la posición que guarda el meristemo con respecto al tejido, así tenemos nódulos esféricos con crecimiento radial cuando el meristemo es central, y nódulos cilíndricos con crecimiento apical cuando el meristemo es distal al tejido (47), los ejemplos son: para el primer caso Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli - Phaseolus vulgaris, y para el segundo caso Rhizobium loti - Leucaena leucocephala (49).

Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli se ha clasificado en dos tipos de cepas, una es R.l.bv.phaseoli tipo I; que tiene reiterados los genes de la nitrogenasa (nif) (53), y nodula efectivamente solo Phaseolus vulgaris; entre estas cepas se encuentran: CFN-42, CFN-285 (15). La otra es R.l.bv.phaseoli tipo II la cual no tiene reiteraciones de los genes nif, pero sí presenta un amplio espectro de hospedero, nodulando efectivamente Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala y Macroptilium atropurpureum. En este grupo se encuentran las cepas: CFN-299 y CIAT

899 (43). La última presenta dos plásmidos: pA y pB, y se sabe que que el pB (de mayor peso molecular) es el plásmido simbiótico (pSym.) (15).

En la mayoría de los Rhizobia se ha demostrado ampliamente que los genes involucrados en el desarrollo del nódulo se encuentran localizados en el plásmido simbiótico (Sym) de las diferentes especies: R.meliloti (41,33), R.l.bv.viciae (21), R.l.bv.trifolii (60), R.l.bv.phaseoli (50), R.cowpea (16), y Rhizobium spp MPIK 3030 (2). En R.meliloti y R.leguminosarum bvs. trifolii, viciae y phaseoli el proceso de nodulación ha sido ampliamente estudiado; los genes de nodulación están cerca de los genes "nif" (40). En los bvs. trifolii y viciae, se encuentran en una sola región, sin embargo en el bv. phaseoli tipo I, los genes de nodulación están reunidos en dos grupos, en el primero los genes nod D C B, y en el segundo, separado por una distancia de aproximadamente 20 Kbs., se encuentra nod A (M.Vazquez y C.Quinto comunicación personal), mientras que los genes comunes de nodulación de la cepa tipo II, se encuentran en un sólo grupo, añadiendo una diferencia entre los Rhizobium leguminosarum bv.phaseoli tipos I y II (ver manuscrito anexo, en prensa en Mol.Microbiol.).

Algunas especies de Rhizobium nodulan más de un hospedero, regularmente cercanos filogenéticamente a la familia, p.ej. R.lotj nodula efectivamente Lotus pedunculatus (71), y algunas cepas nodulan Leucaena esculenta (51). En otros casos, Rhizobium spp cepa NGR 234, aparentemente similar a la cepa MPIK 3030, nodula efectivamente Vigna unguiculata, Glycine ussuriensis

sis, Macroptilium atropurpureum y Leucaena leucocephala entre otros (4), al igual que Rhizobium spp MPIK 3030.

Los genes de nodulación hospedero específicos han sido definidos por dos criterios:

a.- como aquellos genes que necesitan ser introducidos en algún Rhizobium para ampliar el espectro de hospedero, además de las plantas, noduladas por la bacteria donadora.

b.- por mutantes defectuosas en nodulación que han alterado los fenotipos de espectro de hospedero, pero los cuales no pueden ser complementados por la introducción de genes correspondientes de otras especies de Rhizobium.

Los genes de especificidad se han empezado a describir en algunos Rhizobia.

En R. meliloti se ha reportado que los genes esenciales, responsables de los pasos tempranos de nodulación, son los genes nod comunes A, B, C y D_{1,2} y 3. Mutaciones en éstos, pueden ser complementados por plásmidos simbióticos de otras especies de Rhizobium. Otros genes se han descrito, y posiblemente estén involucrados en nodulación hospedero específica (hcn) (33), actualmente, se conoce que los genes nod H, nod P y nod Q son de especificidad de hospedero, ya que sus productos (señales), están involucrados en la modificación de los productos de los genes nod comunes. Usando cepas mutantes sobreproductoras de éstas señales, se ha logrado purificar la señal específica para alfalfa, que es un tetrasacárido D-glucosamina B-1,4-sulfatado con una Mr.=1,102 D (38).

En R. l. bv. trifolii, los genes de especificidad,

nod F.E.L.M.N y una fase abierta de lectura (nod P), están contenidos en un fragmento Hind III de 14 Kb., nod P es el que determina la naturaleza de la leguminosa que puede ser infectada, nod L permite el encurvamiento del pelo radicular y en combinación con nod FEP ó nod MN confiere una baja capacidad de nodular trébol blanco y subterraneum, de donde se deduce, que nod L, es requerido para la nodulación de trébol; nod FEP y nod MN juntos, aumentan la nodulación de tales hospederos. Se predice que los genes hsn, juegan un papel activo en el encendido de la respuesta de defensa de la planta (32). El gen nod D ó los nod FEL del bv. trifolii incrementan significativamente la nodulación de Trifolium subterraneum cuando son introducidos a R.l.bv.viciae, concluyendo que la especificidad por el hospedero, está codificada por varios y diferentes genes nod.

En R.l.bv.viciae además de los genes esenciales de nodulación, se encuentra una región adicional necesaria para nodular trebol blanco y otra que influye en la eficiencia de nodulación; el gen nod D esta reiterado y su función es similar a la de los genes hsn (65). Se han caracterizado los genes de nodulación, y los de especificidad del hospedero, que son nod L.M.N, con sus productos génicos de aproximadamente, 20 000, 65 000, y 18 000 D. respectivamente, la transcripción de éstos genes se induce por compuestos flavonoides y la inducción depende del gen nod D, los genes nod M,N se encuentran en el mismo operón, y nod L en el operón de los genes nod F.E. Por homología, estos, se han encontrado en R.l.bv.trifolii, pero no en R.meliloti ni en B.japonicum, una mutación en nod L reduce fuertemente la

nodulación, no así en nod M y nod N donde el efecto es ligero (66). De los genes descritos, nod E juega un papel clave (pero no esencial), ya que con genes adicionales como nod F, nod FL ó nod FLM es capaz de incrementar consecuentemente la nodulación hospedero específica (65). Se ha descrito un nuevo gene, nod T; una inserción en nod T provoca el retardamiento de la nodulación en Trifolium subterraneum pero no así en Vigna sativa (28), por secuencia se sabe que nod T está conservado en otros biovares de Rhizobium leguminosarum. El producto de nod T, es una proteína típica de membrana externa, además la unidad de transcripción del gen nod T es inducible por flavonoides (hesperina) y no pertenece al operón ABCIJ (67).

Otro gen de nodulación, recientemente reportado es el gen nod O. El producto de este gen es una proteína exportada, por un mecanismo que no involucra el grupo amino terminal y además, tiene semejanza con otras proteínas, como son: ciclolisina, leucotoxina, hemolisina y algunas proteasas. Esta proteína puede unir Ca^{2+} por lo que se propone, que puede interaccionar con células de raíz de la planta por una vía dependiente de Ca^{2+} , que ocurrirá en el estado temprano del reconocimiento. Además tampoco pertenece al operón nod ABCIJ. (23).

En Rhizobium spp cepa NGR 234, también se han clonado los genes de especificidad para siratro, estos se encuentran flanqueando un gen semejante (por hibridación) a nod D, que al parecer no ejerce efecto de control sobre los genes de especificidad que lo rodean, estos genes, se encuentran en DNA plasmídico (5), que porta la información para nodular no solo

siratro, sino además otras leguminosas como: Vigna unguiculata, Glycine ussuriensis y Leucaena leucocephala. Recientemente, se ha reportado que una mutación sobre el gen funcional nod D₁, logra disminuir el espectro de hospedero, y detener el efecto de activación sobre otros genes, ensayos de expresión con fusiones Lac, demuestran que además del gen nod D₁, existen otros loci que son expresados constitutivamente, no existiendo evidencia de una autorregulación del gen nod D₁. Sin embargo, ejerce función regulatoria sobre el gen nod 81, (que interviene en el proceso de nodulación), en presencia de exudados radiculares de varias plantas, también de inductores comerciales, incluyendo compuestos que antagonizan la inducción de genes nod en otros Rhizobia (4).

En Rhizobium spp cepa MPIK 3030, los genes comunes de nodulación, se encuentran alejados de los genes "nif". Mutaciones en la zona de alta homología con nod C, son incapaces de nodular plantas de siratro (2). Los genes de especificidad se encuentran en un fragmento del plásmido simbiótico, que introducido a R.meliloti (el cual es incapaz de nodular en forma natural a plantas de siratro), ahora, con éste fragmento extiende su espectro de hospedero. Por ensayos de complementación, se sabe que los genes nod y hsp mutados de R.meliloti, no pueden ser complementados, por el fragmento derivado de MPIK 3030 (1). El producto del gen nod D₁, promueve la inducción de otros genes nod, por su interacción específica con compuestos de la planta, así R.meliloti (sin sus genes hsp) portando el gen nod D₁ de MPIK 3030, es capaz de nodular al hospedero ilegítimo siratro. Comparando la secuencia de aminoácidos del producto del gen nod D₁,

con el producto del gen nod D de R.meliloti, se encuentra una diferencia, en la secuencia de la región -COOH terminal. Ensayos enzimáticos con bacterias llevando genes quiméricos, de nod D de R.meliloti / nod D₁ de MPIK 3030, sugieren que la región -COOH terminal, es responsable de la interacción con factores de la planta, y posiblemente en la especificidad de interacción con factores de la planta hospedera (30).

III.-OBJETIVO

R.l.bv.phaseoli CIAT 899 es una cepa con amplio espectro de hospedero, que nodula efectivamente no solo Phaseolus vulgaris, sino también Leucaena leucocephala (huaje) y Macroptilium atropurpureum (siratro).

El objetivo central de nuestro trabajo fué aislar y caracterizar la región de DNA de R.l.bv.phaseoli CIAT 899, capaz de extender el espectro de hospedero a una cepa de R.l.bv.phaseoli tipo I, con un espectro restringido de hospedero, utilizando como receptora la cepa CE-3.

Se estableció una colaboración con el Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla, España, que incluye parte de éste trabajo, el cual se encuentra en prensa, en Molecular Microbiology, y se anexa una copia.

IV.-MATERIAL Y METODOS

Cepas y plásmidos.

En la tabla 1, se encuentran enlistadas las cepas y plásmidos que se utilizaron en este trabajo.

Medio y condiciones de cultivo.

Las diversas cepas de R.l.bv.phaseoli utilizadas en éste estudio se crecieron rutinariamente en medio rico PY (peptona de caseína 5 g., extracto de levadura 3 g., CaCl_2 0.809 g., agar 15 g. en 1000 ml. de agua). Las cepas de E.coli y Agrobacterium fueron crecidas rutinariamente en medio LB. Las temperaturas de crecimiento fueron de 30°C para Rhizobium y Agrobacterium y de 37°C para E.coli.

Enzimas e isótopos.

Las endonucleasas de restricción, ligasa de T4 y fosfatasa alcalina de intestino de cabra, fueron obtenidas de Biolabs (U.S.A.) y los isótopos se obtuvieron de Amersham,Co. utilizados conforme indicaciones del fabricante.

Transferencia de plásmidos por conjugación.

La librería genómica se construyó a partir de DNA total de la bacteria R.l.bv.phaseoli cepa CIAT 899, parcialmente digerido con la nucleasa Eco RI. Se clonó en el plásmido pSUP205 el cual lleva los segmentos cos y mob (61), preservandose en E.coli K 802. El banco genómico se conjugó individualmente (en parche) con el plásmido ayudador pNC206, (éste plásmido porta el segmento mob, por el que, presumiblemente recombina con el plásmido pSUP205, formando un cointegrado) y posteriormente con

R.l.bv.phaseoli cepa CE-3 (48). Se seleccionaron transconjugantes portadoras del cointegrado (pSUP205::pNC206), por el criterio de crecimiento en antibióticos marcadores a la concentración final señalada en ug/ml.: Tc.10, Km.30, Sm.100 y Nal.10. Se utilizó el plásmido pNC206 ya que éste es capaz de replicarse en Rhizobium, a diferencia del plásmido pSUP205, que no lo hace.

Manipulación de DNA.

Se aisló DNA plasmídico y genómico, esencialmente como lo describe Birnboim y Doly (1979) y Maniatis (1982) (42).

Experimentos de transformación se realizaron por el método que utiliza el CaCl_2 (42).

Los fragmentos de DNA de los plásmidos, así como de las digestiones de DNA total, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, y se transfirieron a filtros de nylon (Hybond N⁺) por la técnica descrita por Southern (62) . El DNA usado como detector fué marcado radioactivamente por "Nick translation" (Rigby 1979) ó por "Multiprime DNA labelling" (conforme instrucciones del fabricante) . La hibridación se realizó en condiciones relajadas a 42°C, y los lavados se hicieron; 2X SSC y 0.1 % de SDS a 55°C, y en otros casos a 4X SSC y 0.1 % de SDS dependiendo de la severidad requerida en los lavados.

Los fragmentos clonados fueron digeridos con la nucleasa Eco RI, posteriormente se adicionó ligasa de T4. se dejó la reacción a temperatura ambiente por 3 Hrs. Con éste material se transformó a la bacteria E.coli HB101(12).

Ensayos de nodulación y actividad de nitrogenasa.

Las transconjugantes de R.l.bv.phaseoli cepa CE-3 pSUP205::pNC206 fueron inoculadas en grupos de 50 clonas en raíces de Leucaena leucocephala, para así seleccionar las que fueron capaces de inducir la formación de nódulos. Las plantas se crecieron en invernadero ó en cámaras de crecimiento (26-30°C). La inoculación se hizo de la siguiente manera: las bacterias se crecieron en medio PY por una noche y posteriormente se centrifugaron y lavaron con $MgSO_4$ 10 mM. A continuación se resuspendieron en la misma solución, e inocularon en un volumen discreto (1 ml. de cultivo por planta). Las semillas de Leucaena leucocephala fueron germinadas como sigue: se lavaron con agua corriente, se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado por espacio de 5-10 min., se removió el ácido, y se adicionó hipoclorito de sodio al 20 % por 20 min., se lavaron con agua estéril y colocaron en cámara húmeda a 30°C por tres días. Las plantulas se colocaron en tubo con agar Fahraeus (24) ó en maceta con vermiculita (sin dejar que las plantas etiolen) e inmediatamente se inocularon. Los tubos son incubados en cámaras de cultivo y las macetas en invernadero, aproximadamente 15 días despues, aparecieron nódulos maduros. Alternativamente se utilizó otra manera de escarificar las semillas de Leucaena leucocephala y Leucaena esculenta : se lavaron las semillas con agua corriente, se colocaron en agua caliente, aproximadamente a 80°C por 10 min. con agitación, se colocaron en hipoclorito de sodio al 20 % por 20 min. , se lavaron con agua estéril y se colocaron en cámara húmeda a 30°C por tres días, despues se sembraron en vaso

con vermiculita estéril, inmediatamente se inocularon. A los 12 días se observó la aparición de nódulos maduros.

La actividad de nitrogenasa fué medida por la reducción de acetileno a etileno, para lo cual se colocó la raíz con los nódulos en un frasco pequeño; se retiró 1ml. de aire y se le adicionó el mismo volumen de acetileno; ésto se incubó 1 hr. a 30°C y se tomaron 0.25 ml. de la mezcla de gases del frasco midiéndose en un cromatógrafo de gases. El peso húmedo de los nódulos fué determinado.

Recuperación de bacterias de los nódulos.

Los nódulos fueron esterilizados superficialmente con hipoclorito de sodio al 20 % por espacio de 10 min., a continuación se lavaron con agua estéril y trituraron, adicionándose 100 ul. de caldo de cultivo e inmediatamente se sembró éste líquido en medio PY (agar) sin antibióticos. Una vez crecidas las bacterias, se seleccionaron las colonias en el mismo medio de cultivo con los antibióticos marcadores, purificándose las colonias.

Visualización del perfil plasmídico.

Para visualizar los plásmidos presentes en la bacteria R.l.bv.phaseoli cepa CE-3 y transconjugantes, se llevó acabo la técnica descrita por Eckhardt (22).

Mutagénesis del fragmento de 6.5 Kb.

Para mutagenizar al inserto del pJM22, se utilizó el transposon mini Mu-Lac, el cual es fácilmente monitoreado por la producción de la enzima B-galactosidasa, y se desarrolló el protocolo descrito por Ratet en 1988 (54).

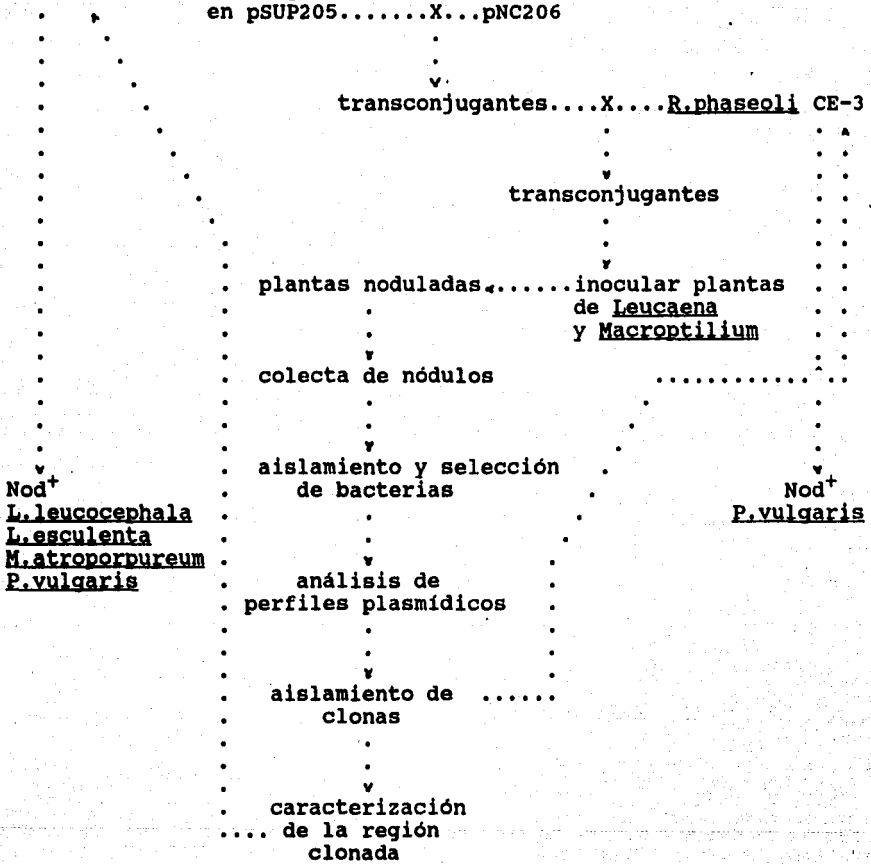
TABLA # 1 Cepas bacterianas y plásmidos

Plásmidos	atribuciones	fuentes
pSUP205	Mob Cos Tc ^r Cm ^r ColE1	Simon <u>et al</u> (1983)
pNC206	IncP1 Cb ^r Km ^r .	A.Pühler.
pJM2	Inserto de 22Kb del pSym de CIAT 899 clonado en pSup 205 Tc ^r Cm ^s .	este trabajo.
pJM21	subclona EcoRI de 16 Kb de pJM 2 en pSUP205 Tc ^r Cm ^s .	este trabajo.
pJM22	subclona EcoRI de 6,2 Kb de pJM 2 en pSUP205 Tc ^r Cm ^s .	este trabajo.
Cepas		
<u>R.phaseoli</u>		
CIAT 899.	Silvestre Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol. Rif ^r Nal ^r .	Martínez <u>et al</u> (1985)
CE-3	Sm ^r derivada de la cepa CFN-42 Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol.	Noel <u>et al</u> (1984)
M5	derivada de CIAT 899.pSym ⁻ pA ⁺ Rif ^r Nal ^r .	Bolhool <u>et al</u>
AD822	derivada de CIAT 899.pSym ⁻ pA ⁺ Rif ^r Nal ^r .	A.Davalos (comunic. personal)
AD4	derivada de CIAT 899.pSym ⁺ pA ⁻ Rif ^r Nal ^r .	A.Davalos (comunic. personal)
CFN-2001	CFN-42 pSym ⁻ Rif ^r .	Palacios <u>et al</u> (1983)
<u>A.tumefaciens</u>		
GMI9023	Rif ^r curada de los plásmidos pA ⁺ y pTi derivada de la cepa C58	Rosenberg <u>et al</u> (1984)
GMI9023 (pCIAT899a)	derivada de GMI9023 mas el pSym de CIAT 899 Rif ^r .	Brom <u>et al</u> (1988)
GMI9023 (pCIAT899ab)	derivada de GMI9023 más pSym y pA de CIAT 899 Rif ^r .	Brom <u>et al</u> (1988)
<u>E.coli</u>		
HB101	F ⁻ hsdS hsdM pro thi gal lacY reca ⁻ Sm ^r .	Boyer et al (1986)

V.- ESTRATEGIA.

R.phaseoli

CIAT 899.....banco genómico
 en pSUP205.....X...pNC206



VI.- RESULTADOS.

Estandarización de los ensayos de nodulación.

Se estandarizaron las condiciones de cultivo de las plantas a utilizar: Leucaena y Macroptilium. En la fig.1 se muestra la nodulación de las dos cepas silvestres ensayadas: R.l.bv.phaseoli CIAT 899, y R.l.bv.phaseoli CE-3.

Complementación de la cepa CE-3 para nodular Leucaena y Macroptilium.

La genoteca de R.l.bv.phaseoli cepa CIAT 899, contenida en aproximadamente 1000 clonas, fué conjugada individualmente (en parche), con el plásmido ayudador pNC 206 con un 100% de eficiencia. Esta construcción fué conjugada individualmente (en parche) con R.l.bv.phaseoli cepa CE-3. Este proceso ocurrió con un 35% de eficiencia (por recuperación de clonas crecidas en los antibióticos marcadores), seleccionando la formación de cointegrados entre los plásmidos pSUP205::pNC206 (DNA pasajero) en la cepa CE-3.

Las 350 transconjugantes obtenidas (CE-3 pSUP205::pNC206), fueron inoculadas a plantas en 7 grupos de 50 clonas. De estos únicamente cuatro grupos fueron capaces de inducir la formación de nódulos en Leucaena. Los grupos fueron denominados G-1, G-2, G-4 y G-5. En la fig.2, se aprecian los nódulos formados en Leucaena (a) y Macroptilium (b), por una de las transconjugantes de cepa CE-3 llevando un cointegrado. De ésta manera se aislaron clonas, que confieren la capacidad de inducir nódulos en Leucaena y Macroptilium a una cepa que era in-

capaz de hacerlo (CE-3).

De los nódulos inducidos por los grupos G-1, G-2, G-4, G-5, se eligieron 4 nódulos de cada planta. Se aislaron 5 colonias de cada nódulo en PY, las cuales fueron resistentes a Tc, Km, Sm, y Nal. Para confirmar que las bacterias aisladas de los nódulos fueran efectivamente transconjugantes (CE-3 pSUP205::pNC206), se analizó su perfil plasmídico por el método de Eckhardt. El perfil plasmídico fué semejante al perfil de la cepa original CE-3, más un plásmido (cointegrado) de menor peso molecular. Este plásmido, varió en peso molecular de un grupo a otro (fig.3). La presencia del cointegrado sugiere que este es el responsable de la nodulación de Leucaena por la cepa CE-3.

Las clonas transconjugantes (CE-3 pSUP205::pNC206) de cada grupo, fueron denominadas: Lp-1, Lp-2, Lp-4 y Lp-5. Los cósmidos correspondientes de éstas transconjugantes se designaron: pJM1, pJM2, pJM4 y pJM5 respectivamente, los cuales fueron transferidos a E.coli HB101, para facilitar su purificación y posterior análisis.

De estas transconjugantes, se eligió la construcción Lp-2, para analizar y corroborar que la región clonada en pJM2, corresponde a información contenida en el DNA de la cepa CIAT 899. Para esto se procedió a hacer digestiones con Eco RI de DNAs totales de las cepas: CIAT 899; M5 y AD822 (derivadas de CIAT 899 pSym⁻, pA⁺); AD4 (derivada de CIAT 899 pSym⁺, pA⁻) y A.tumefaciens cepas GMI 9023(55), GMI 9023(pCIAT 899b) y GMI 9023(pCIAT 899ab), (pSym⁺ y pSym⁺, pA⁺ de CIAT 899 respectivamente)(15), transfiriendolos a nitrocelulosa

(Southern), para después hacer hibridación DNA-DNA, utilizando como sonda el cósmido pJM2. Los resultados se muestran en la fig.4. Se aprecia hibridación con CIAT 899, AD4, GMI9023(pCIAT899b) y GMI9023(pCIAT899ab), obteniéndose dos bandas, que corresponden en tamaño, a los fragmentos de Eco RI, clonados en pJM2. En cambio en las cepas M5 y AD822 que no llevan el pSym, no se obtuvo ninguna señal de hibridación. De estos resultados podemos concluir que el cósmido pJM2 lleva clonada información presente en el pSym de la cepa CIAT 899, la cual es capaz de complementar a la cepa CE-3 para nodular Leucaena y Macroptilium.

Delimitación de la región que confiere espectro amplio de hospedero a la cepa CE-3.

Con el objeto de delimitar la región clonada de la cepa CIAT 899 que confiere un espectro amplio de hospedero a la cepa CE-3, el cósmido pJM2 fué digerido con EcoRI y subclonado en el mismo sitio del plásmido pSUP205, dando origen a las subclonas pJM21 y pJM22, conteniendo insertos de 17 y 6.5 Kb. respectivamente, fig.5.

Los plásmidos pJM21 y pJM22 fueron transferidos por conjugación (con el plásmido ayudador pNC206) a la cepa CE-3, (material y métodos), obteniéndose las transconjugantes CE-3/pJM21 y CE-3/pJM22, (fig.6).

Se realizaron ensayos de nodulación con el fin de determinar cual subclona era capaz de complementar a la cepa CE-3 para nodular Leucaena y/o Macroptilium. Se inocularon diez plantas de Leucaena por ensayo, con las transconjugantes CE-3/pJM21 y

CE-3/pJM22. Los nódulos formados por Leucaena, fueron ensayados para actividad de nitrogenasa (reducción de acetileno). Los resultados de la tabla 2 muestran, que unicamente la cepa CE-3/pJM22 indujo la formación de nódulos efectivos en raíces de Leucaena. (fig.7). Resultados similares fueron obtenidos en varios ensayos.

TABLA No.2

.....			
cepa		<u>L.esculenta</u>	
	Nod	# nod/planta	(mg) nod
.....			
CIAT 899	+	20	359
CE-3/pJM2 (Lp-2)	+	14	85
CE-3/pJM21	-	-	-
CE-3/pJM22	+	6	44
CE-3/pJM22::Mu(52)	-	-	-
CE-3/pJM22::Mu(50)	+	21	20
AD822/pJM2	-	-	-
CFN-2001/pJM2	-	-	-
.....			

Para descartar que una secuencia similar a la presente en el fragmento de Eco RI de 6.5 Kb. clonado en pJM22, estuviera presente en la cepa CE-3, se hibridó en condiciones poco estrictas, éste inserto con genomas totales digeridos con Eco RI, de las cepas: CE-3, CIAT 899 y AD822. No se obtuvo señal

de hibridación con la cepa CE-3, ni con AD822 (pSym⁻). La banda que hibrida con CIAT 899, corresponde a la clonada en pJM22 y no parece estar reiterada. De estos datos podemos concluir, que la región mínima de DNA de la cepa CIAT 899, (llevada por la cepa CE-3), que puede inducir la formación de nódulos en plantas de Leucaena, está contenida en un fragmento de 6.5 Kb. de Eco RI (fig.8); aunque los nódulos inducidos, son menor en número que los inducidos por CE-3/pJM2 (Lp-2) y por la cepa silvestre CIAT 899.

Hibridación de pJM22 con detectores específicos.

En Rhizobium meliloti los genes nod D determinan la activación de los genes comunes de nodulación, sin embargo recientemente se ha descrito, que uno de éstos es capaz de funcionar como determinante de especificidad (64,65). Para determinar si en pJM22 ocurría de forma similar, se hibridó pJM22 con el gen nod D de R.meliloti, usando un fragmento interno de nod D de 0.35 Kb.(Bgl II/Ava I). Se encontró homología entre ambos DNA's, fig.9. Además el pJM22 se hibridó con el gen nod C de R.meliloti, usando un fragmento interno de nod C (Hind III), dando señal de hibridación, los genes nod AB también se encuentran en éste mismo fragmento (datos no mostrados aquí, pero sí en C.Vargas et al. en prensa, que se anexa).

Pérdida del fenotipo de nodulación en Leucaena.

Se realizó una mutagénesis de pJM22, usando el transposon mini Mu-lac.(54), obteniéndose 14 inserciones diferentes en el segmento. Las inserciones fueron transferidas a R.l.bv.phaseoli cepa CE-3 (material y métodos), y ensayadas en

plantas de Leucaena para conocer su fenotipo de nodulación. Se encontró que sólo una presentó el fenotipo Nod⁻. Se determinó el mapa físico del segmento de 6.5 Kb. fig.10.

Via.-ADICIONAL.

Algunos plásmidos construidos en éste trabajo, fueron empleados en el trabajo en prensa que se anexa. Para fines prácticos se cambian de nombre y para evitar confusiones, se hace saber.(fig.1 de C.Vargas et al)

este trabajo		C.Vargas, <u>et al</u> .
pJM2	=	pcV3820.
pJM21	=	pcV3821.
pJM22	=	pcV3822.

VII.-DISCUSION.

En la mayoría de los Rhizobia, los genes de nodulación han sido ampliamente caracterizados, posteriormente, lo fueron los genes de especificidad, p.ej. en R.meliloti, en R.l.bv.trifolii y viciae, y en Rhizobium spp. cepa NGR234, los genes de especificidad han sido descritos y estan siendo estudiados. Sin embargo en R.l.bv.phaseoli el estudio de los genes comunes de nodulación, es reciente y los genes de especificidad en éste biovar, no estaban explorados.

La expresión de los genes de especificidad, permiten la interacción específica del Rhizobium con la correspondiente leguminosa huésped. Los genes de especificidad en R.meliloti se encuentran en el pSym, cerca de los genes nif (69), estos genes h_{sn} (nodulación hospedero específica), se denominan h_{sn} A. B. C y D (nod F. E. G y H). Mutaciones en estos genes, afectan la nodulación a diferentes grados. Mutaciones en el gen h_{sn} D, produce una alteración en el espectro de hospedero. Los genes h_{sn} A. B y C controlan el crecimiento del hilo de infección, mientras que el gen h_{sn} D, es requerido para el enroscamiento del pelo radicular, hospedero específica (31). Esto se ha demostrado mediante la expresión de los genes nod comunes y h_{sn} D, sugiriendo que estos genes estan involucrados en la producción de factores que intervienen en el fenotipo Hac (enroscamiento del pelo) (3). Se han identificado otros genes de especificidad, denominados nod H y nod Q, involucrados en la producción de señales nod (38). Estos genes, transferidos a

R.l.bv.viciae lo incapacitan para infectar y nodular alfalfa (hospedero normal de R.meliloti), así como inhiben la capacidad de infectar y nodular su hospedero natural. Un análisis de los sobrenadantes de sus cultivos, demuestra que, estos determinan la correlación entre especificidad y comportamiento simbiótico, ya que se encuentran factores extracelulares activos sobre alfalfa ó chicharo y depende de nod H y nod Q (25). Uno de los genes comunes de nodulación, nod D actúa como gen determinante de especificidad. El producto de este gen, junto con compuestos flavonoides de la planta, activa la transcripción de otros genes de nodulación. Bajo la acción de algunas señales de la planta, es capaz de determinar la especificidad por el hospedero (48,63,57). Además, los diferentes genes nod D, responden de manera diferente a exudados de raíz, de una variedad de plantas, así como a inductores comerciales. El gen nod D₁ de R.meliloti es capaz de complementar a su homólogo en R.l.bv.trifolii, pero no el de la cepa NGR234. Esta complementación es posible con nod D₂ ó nod D₃ más el gen syr M de R.meliloti (29). En R.l.bv.trifolii, una mutación en nod D promueve la ampliación del espectro de hospedero (parasponia y siratro), además de causar alteración en funciones regulatorias y de reconocimiento de moléculas inductoras, es capaz de inducir la expresión de nod A independientemente de la adición de inductor, esto es causado por un solo cambio de bases (45). En R.l.bv.viciae, una mutación en nod D puede causar la pérdida de la autoregulación y además la pérdida de la capacidad de activar a otros genes nod (LMN). Los genes nod L, nod M y nod N, están involucrados, en la nodulación eficiente hospedero

específica. Mutaciones en nod L, reducen la nodulación en chicharo, pero no en haba. Se reduce la nodulación en haba cuando la mutación es en nod M ó nod N (66). El gen nod X de R.leguminosarum (cepa TOM) es el responsable del fenotipo de nodulación en P.sativum cv. Afghanistan (46).

En los Rhizobia con amplio espectro de hospedero, el gen nod D tiene influencia en la determinación del espectro de hospedero, por su amplia interacción con diferentes componentes de los exudados de raíces de diversas plantas (a diferencia del gen nod D de R.meliloti que interacciona específicamente con luteolina) (30). Sin embargo los genes de especificidad encontrados en un segmento de DNA (11.4 Kb.) de la cepa MPIK3030 portados por R.meliloti, es capaz de inducir nodulación en siratro (1). En Rhizobium spp. NGR234, una región de DNA capaz de ampliar el espectro de hospedero de R.l.bv.trifolii, porta un gen similar a nod D (por hibridación), que al mutar, no puede ser complementado por el gen nod D de R.l.bv.trifolii. Además, cuando las mutaciones están en la región que flanquea al gen parecido a nod D, se pierde el fenotipo de extensión de espectro de hospedero (4). Esta región de DNA de la cepa NGR234, más la región de nodulación de R.l.bv.trifolii, son capaces de inducir nodulos en plantas de siratro, cuando son introducidos a Rhizobium que no lleva su pSym (5).

En Rhizobium spp. NGR234, se han encontrado otros genes, que están involucrados en la nodulación hospedero específica. Los genes nod S y nod U precedida por su nod box se encuentran localizados en la región descrita como HsnII. El gen

nod S controla la nodulación de Leucaena leucocephala y nod SU regulan la nodulación de Desmodium intortum y Vigna unguiculata. Estos nod box, son regulados por naringenina. Se han encontrado (por hibridación), en B.japonicum y mutaciones en éstos genes, no alteran el comportamiento de nodulación de B.japonicum sobre soya, cowpea y siratro. (27,39).

En R.l.bv.phaseoli, el estudio de los genes comunes de nodulación, es reciente y los genes de especificidad en este bv., están poco explorados. Los determinantes de especificidad, parecen ser diferentes en las cepas tipo I y II. En las cepas tipo I, los polisacáridos tienen influencia. Mutaciones en los genes lps de la cepa CFN-42, retardan la inducción de nódulos, así como se ve disminuida la actividad de nitrogenasa y el número de células infectadas, también es reducido. Estos genes (lps), transferidos a mutantes en polisacáridos de R.l.bv.trifolii, son capaces de inducir nódulos, grandes y rojos que desarrollan una buena actividad de nitrogenasa (14). Sin embargo, no se han caracterizado genes específicos.

Para las cepas tipo II (CIAT 899), un fragmento del plásmido simbiótico (pJM2), puede dar la capacidad de inducir nódulos, a una cepa tipo I (CE-3). Este segmento ha sido reducido en tamaño hasta 6.5 Kb.(pJM22), conservando el fenotipo de nodulación en esa cepa. Aunque es menor el número de nódulos (niveles equivalentes al 60% de la cepa silvestre, en el primer caso y 40% en el segundo), la actividad de nitrogenasa de nódulos inducidos por pJM22, es equivalente a la presentada por la cepa

silvestre, no sucede así para nódulos inducidos por pJM2. Estas diferencias, pudieran deberse a la ausencia de algunas regiones de DNA del pSym, en estos plásmidos, ya que además no son capaces de inducir nodulos en cepas pSym⁻ de CIAT 899.

El plásmido pJM22 mostró homología por hibridación con el gen nod D de R.meliloti, así como con los genes nod A, B y nod C. Dado que éstos últimos genes son intercambiables, es posible suponer que es el gen nod D, el que juega un papel importante para ampliar el espectro de hospedero, ó pudiera ser el directamente responsable, ya que el plásmido pCV3802 (ver artículo anexo), que porta el gen nod D y un pequeño fragmento de DNA (ausente en pJM22=pCV3822) es capaz de inducir nodulación en Leucaena por la cepa CE-3 (tabla 1, C.Vargas et al), lo que sería, mediante su capacidad de interaccionar con diferentes compuestos inductores, presentes en el exudado radicular de diferentes plantas ó bien por su capacidad de inducción sobre algunos genes de nodulación en presencia de aquellos componentes (5,4,30,73).

El plásmido pJM22, pierde su capacidad de inducir nodulación en leucaena, en el fondo de la cepa CE-3, por la inserción del transposon mini Mu-lac. Es necesario definir exactamente el sitio de la inserción, para determinar cual es el gen directamente responsable. Los resultados apuntan, a que pudiera ser el gen nod D (éste trabajo y C.Vargas et al). Esto sería un caso más, en donde el gen nod D está involucrado en ampliar el espectro de hospedero, en presencia o ausencia de inductores (45,13).

Como ya se mencionó, presumiblemente el gen nod D, esta involucrado en la determinación del espectro de hospedero. Sin embargo, falta determinar con claridad, si es éste gen. Se propone caracterizar el fragmento que lo porta, así como secuenciar dicho gen, además de ver, si funcionalmente es el gen nod D.

VIII.-CONCLUSION.

Los datos obtenidos en el presente trabajo, sugieren importantemente que, el gen nod D o los genes aledaños, de la cepa CIAT 899, juega(n) un papel importante, en la determinación del espectro de hospedero.

Los dos tipos de cepas de R.l.bv.phaseoli, tienen diferencias significativas, como son: reiteraciones de los genes nif, separación de los genes nod comunes y espectro de hospedero. A éste respecto, la diferencia funcional del gen nod D es muy notoria. Nuestros ensayos, indican que un fragmento de 6.5 Kb. de DNA de la cepa CIAT 899, conteniendo los genes nod ABC y nod D, es capaz de ampliar el espectro de hospedero de la cepa CE-3. Sin embargo, éste fragmento, no es capaz de inducir el mismo fenómeno en cepas curadas del pSym (AD822 y CFN 2001). Esto parece indicar, que la determinación del espectro de hospedero, depende de más de un gen del plásmido simbiótico.

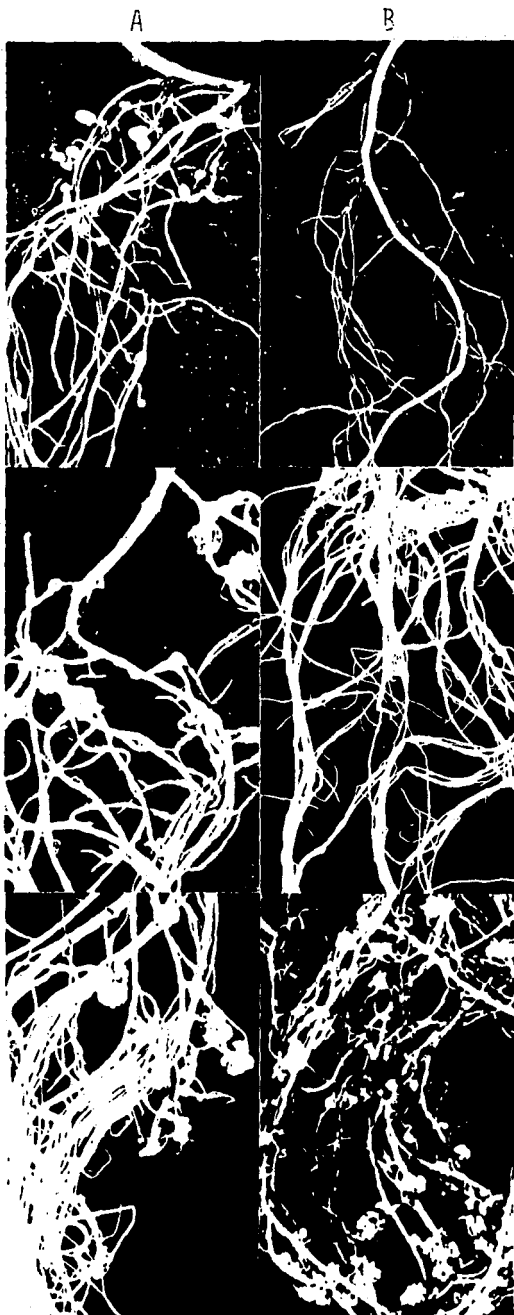


Fig.1. Nodulación inducida en raíces de huaje, siratro y frijol, inoculadas con R.l.bv.phaseoli.
(A) CIAT899
(B) CE-3.

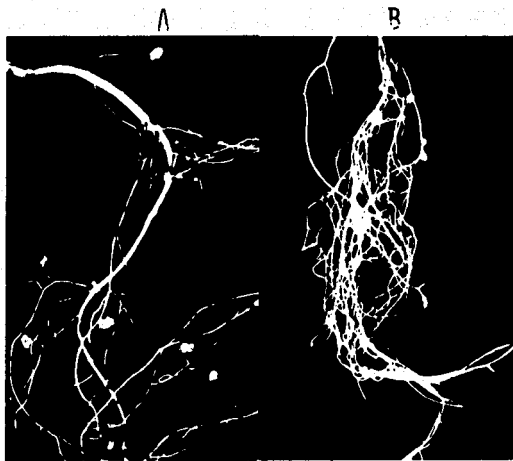


Fig.2. Nodulación inducida por la cepa transconjugante CE-3/pJM2 (Lp-2), en huaje (A) y siratro (B).



Fig. 3. Perfil plasmidico de algunas transconjugantes, aisladas de nódulos de huaje (Eckhardt). Lp-1;-2;-4;-5 (1-4) y CIAT 899 (5).

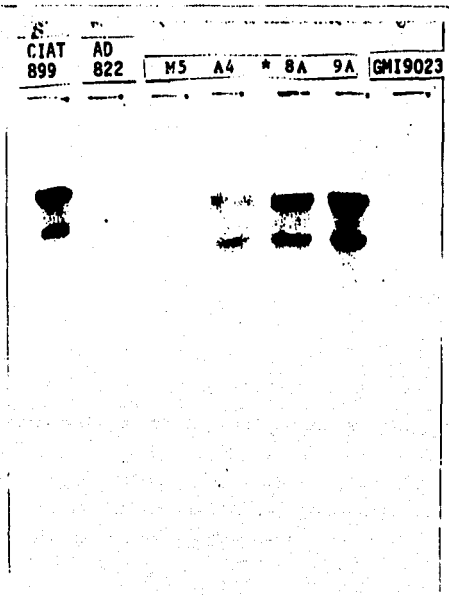


Fig.4. Hibridación de genomas totales de *R.l.bv.phaseoli* y *A.tumefaciens* contra pJM2 (Lp-2). ver texto.

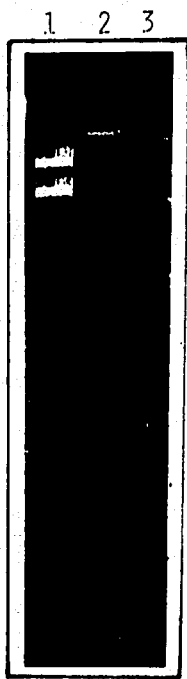


Fig.5. Subclonación del plásmido pJM2(3) en el vehículo pSUP205, generando los plásmidos pJM21 con 17 Kb.(1) y pJM22 con 6.5 Kb.(2).

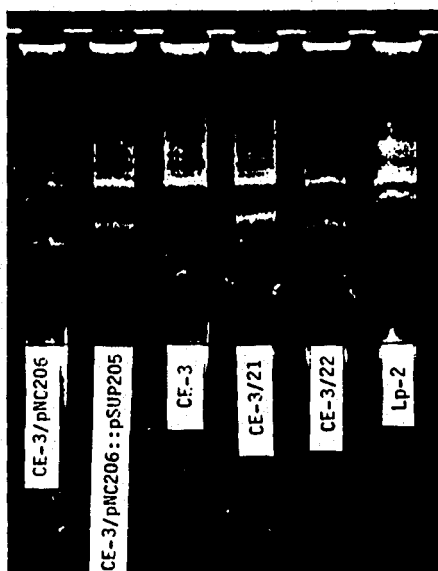


Fig. 6. Perfil plasmidico de transconjugantes obtenidas por la introducción de los plásmidos pJM21 y pJM22, a la cepa CE-3, generando las cepas que se inocularon a huaje y siratro.

CE-3

CE-3/pJM22



Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

CE-3

DATA OBTENIDA EN DIA 2 12

pJM-2

TIC 12/10/1977 12:45:45. Exp. "A" PPA 1.

FILE 1. SEÑALADO N. DIA 12. LINDAS 12. DIA 12

PLANO	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT
1	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
2	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
3	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
4	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
5	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
6	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
7	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
8	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
9	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
10	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
TOTAL	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

CE-3

DATA OBTENIDA EN DIA 2 12

etileno

TIC 12/10/1977 12:45:45. Exp. "A" PPA 1.

FILE 1. SEÑALADO N. DIA 12. LINDAS 12. DIA 12

PLANO	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT
1	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
2	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
3	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
4	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
5	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
6	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
7	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
8	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
9	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
10	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
TOTAL	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

CE-3

DATA OBTENIDA EN DIA 2 12

pJM-2/22

TIC 12/10/1977 12:45:45. Exp. "A" PPA 1.

FILE 1. SEÑALADO N. DIA 12. LINDAS 12. DIA 12

PLANO	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT
1	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
2	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
3	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
4	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
5	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
6	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
7	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
8	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
9	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
10	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
TOTAL	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

CE-3

DATA OBTENIDA EN DIA 2 12

sin inoc.

TIC 12/10/1977 12:45:45. Exp. "A" PPA 1.

FILE 1. SEÑALADO N. DIA 12. LINDAS 12. DIA 12

PLANO	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT
1	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
2	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
3	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
4	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
5	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
6	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
7	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
8	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
9	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
10	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
TOTAL	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

CE-3

DATA OBTENIDA EN DIA 2 12

pJM-2/22: (Hu(52))

TIC 12/10/1977 12:45:45. Exp. "A" PPA 1.

FILE 1. SEÑALADO N. DIA 12. LINDAS 12. DIA 12

PLANO	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT
1	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
2	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
3	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
4	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
5	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
6	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
7	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
8	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
9	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
10	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
TOTAL	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

CE-3

DATA OBTENIDA EN DIA 2 12

CIAT B99

TIC 12/10/1977 12:45:45. Exp. "A" PPA 1.

FILE 1. SEÑALADO N. DIA 12. LINDAS 12. DIA 12

PLANO	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT	SEÑALADO	OT
1	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
2	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
3	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
4	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
5	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
6	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
7	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
8	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
9	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
10	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00
TOTAL	0.000	0.00	11.000	0.00	11.000	0.00

Experimento 2. Cuentas 12/10/1977 12:45:45. STIMULOS NO DIA 2 12

Fig. 7. Perfil plasmidico de distintas colonias obtenidas de la cepa CE-3/pJM22, aislada de nódulo de huaje (A). Reducción de acetileno presentada, por algunas cepas inoculadas (B).

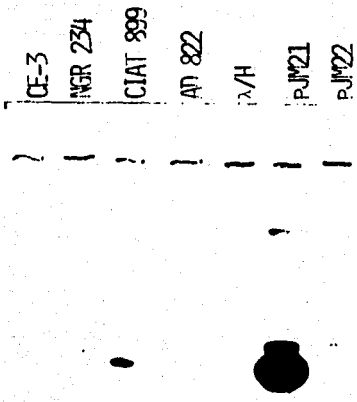


Fig.8. Hibridación de pJM22, contra genomas totales de CIAT899 y CE-3. Aparece una señal, que corresponde al fragmento de 6.5 Kb.

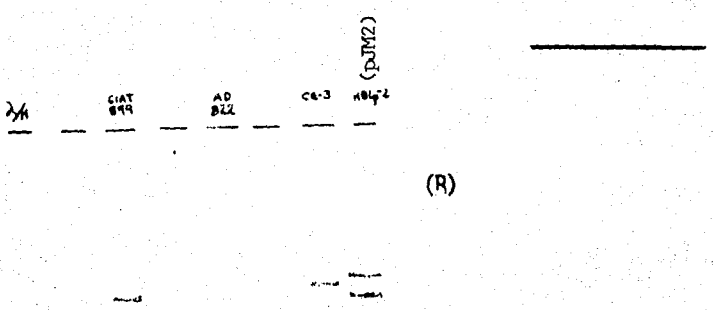
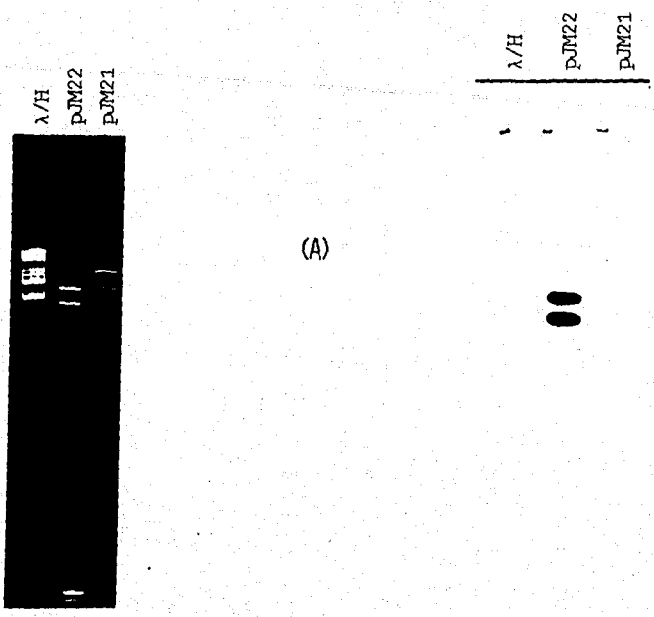


Fig.9. Homología del fragmento de 6.5 Kb. con otros detectores como *nod D* (A) y *nod C* (B). se observa señal con ambos detectores.

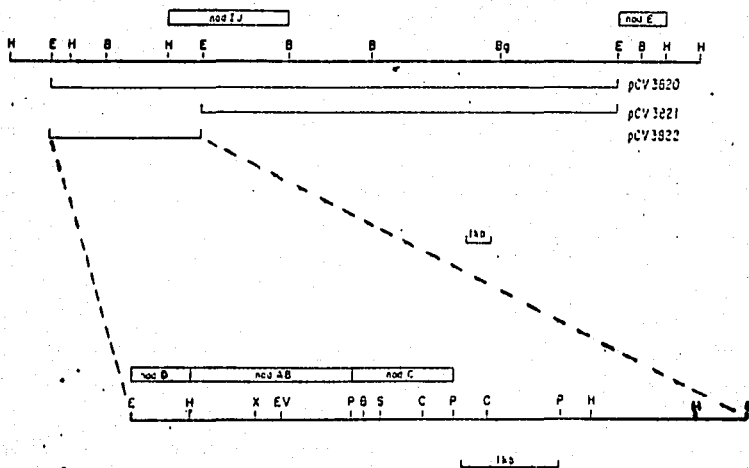


Fig.10. Mapa físico del segmento de 6.5 Kb. del plásmido pJM22, el cual porta la región mínima, capaz de hacer nodular a huaje por la cepa CE-3.

IX.- BIBLIOGRAFIA.

1....Bachem, C.W.B.; Banfalvi, Z.; Kondorosi, E.; Schell, J. & Kondorosi, A. 1986. "Identification of host-range determinants in the Rhizobium species MPIK 3030".

Mol.Gen.Genet. 203:p.42-48.

2....Bachem, C.W.B.; Kondorosi, E.; Banfalvi, Z.; Horvath, B.; Kondorosi, A.; & Schell, J. 1985. "Identification and cloning of nodulation genes from the wide host-range Rhizobium strain MPIK 3030".

Mol.Gen.Genet. 199:p.271-278.

3....Banfalvi, Z.; and Kondorosi, A. 1989. "Production of root hair deformation factors by Rhizobium meliloti nodulation genes in Escherichia coli: hsn D (nodH) is involved in the plant host-specific modification of the nod A B C factor"

Plant Mol.Biol. 13:p.1-12.

4....Bassam, B.J.; Djordjevic, M.A.; Redmond, J.W.; Batley, M.; & Rolfe, B.G. 1988. "Identification of a nod D-dependent locus in the Rhizobium strain NGR 234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes".

Molecular Plant-Microbe Interactions, 1:p.161-168.

5....Bassam, B.J.; Rolfe, B.G.; & Djordjevic, M.A. 1986. "Macroptilium atropurpureum (siratro) host specificity genes are linked to a nod D-like gene in the broad host range Rhizobium strain NGR 234".

Mol.Gen.Genet. 203:p.49-57.

6....Bauer, W.D.; Bhuvanewari, T.V.; Calvert, H.E.; Law, I.J.; Malik, N.S.A.; and Vesper, S.J. "Recognition and infection by slow-growing Rhizobia".

Nitrogen Fixation Research Progress.

Evans, H.J. & Bottomley, P.J. (eds). Martinus Nijhoff Publishers.

7.... Bergmann, H.; Preddie, E.; and Verma, D.P.S. 1983. "Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules".

The EMBO Journal. 2:p.2335-2339.

8.... Bhuvaneswari, T.V.; and Solheim, B. 1985. "Root hair deformations in the white clover/Rhizobium trifolii symbiosis."

Physiol. Plant. 63::p.25-

9.... Bhuvaneswari, T.V.; Turgeon, B.G.; and Bauer, W.D. 1980. "Early events in the infection of soybean (Glycine max L. Merr) by Rhizobium japonicum".

Plant Physiol. 66:p.1027-1031.

10... Bisseling, T.; van den Bos, R.C.; and van Kammen, A. 1977. "Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids and corresponding broth-cultured Rhizobium bacteria".

J. Gen. Microbiol. 101:p.79-84.

11... Bisseling, T.; Been, C.; Klugkist, J.; van Kammen, A.; and Naddler, K. 1983. "Nodule-specific host proteins in effective and ineffective root nodules of Pisum sativum".

The EMBO Journal. 2:p.961-966.

12... Boyer, H.S.; and Rouland-Dussoix, D. 1969. "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli".

J. Mol. Biol. 41:p.459-472.

13... Burn, J.E.; Hamilton, W.D.; Wootton, J.C.; and Johnston, A.W.B. 1989. "Single and multiple mutations affecting properties of the

regulatory gene nodD of Rhizobium."

Molecular Microbiology. 3:p.1567-1577.

14...Brink, B.A.; Miller, J.; Carlson, R.W.; and Noel, K.D. 1990.

"Expression of Rhizobium leguminosarum CFN42 genes for lipopolysaccharide in strains derived from different R.leguminosarum soil isolates."

J.Bact. 172:p.548-555.

15...Brom, S.; Martínez, E.; Davila, G.; & Palacios, R. 1988. "Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of Rhizobium spp. strains that nodulate Phaseolus vulgaris".

App. Environ. Microbiol. 54:p.1280-1283.

16...Brownton, W.J.; Heyke, N.; Meyer, H. Z.A. & Pankhurst, C.E. 1984.

"Plasmid-linked nif and nod genes in fast-growing rhizobia that nodulate Glycine max, Psophocarpus tetragonolobus, and Vigna unguiculata".

P.N.A.S. (USA) .81:p.3093-3097.

17...Campos, A.; Padilla, J.; Vazquez, M.; Ortega, J.L.; Enriquez, C.; and Sanchez, F. 1987. "Expression of nodule-specific genes in Phaseolus vulgaris L."

Plant Mol. Biol. 9:p.521-532.

18...Dart, P.J. "The infection process. Cap.11. Development of root-nodule symbioses".

The Biology of Nitrogen Fixation. A. Quispel (ed)

American Elsevier Publishing Co. Inc. N.Y.

19...Dazzo, F.B.; Truche, G.L.; Sherwood, J.E.; Hrabak, E.M.; and Gardiol, A.E. 1982. "Alteration of the trifoliin A-binding capsule of Rhizobium trifolii 0403 by enzymes released from clover

roots".

App. Environ. Microbiol. 44:p.478-490.

20...Djordjevic, M.A.; Schofield, P.R.; & Rolfe, B.G. 1985.

"Tn5 mutagenesis of Rhizobium trifolii host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability".

Mol. Gen. Genet. 200:p.463-471.

21...Downie, J.A.; Qing-Sheng, Ma.; Knight, C.D.; Hombrecher, G.; &

Jhnston, A.W.B. 1983. "Cloning of the symbiotic region of Rhizobium leguminosarum: the nodulation genes are between the nitrogenase genes and a nifA-like gene".

The EMBO Journal. 2:p.947-952.

22...Eckhardt, T. 1978. "A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria".

Plasmid. 1:p.584-588.

23...Economou, A.; Hamilton, W.D.O.; Johnston, A.W.B. & Downie, J.A.

1990. "The Rhizobium nodulation gene nod Q encodes a Ca²⁺-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins"

The EMBO Journal. 9:p.349-354.

24...Fahraeus, G. 1957. "The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique".

J. Gen. Microbiol. 16:p.374-381.

25...Faucher, C.; Camut, S.; and Truchet, G. 1989. "The nodH and nodQ host range genes of Rhizobium meliloti behave as avirulence genes in R. leguminosarum bv. viciae and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals."

Molecular Plant-Microbe Interactions. 2:p.291-300.

26...Gillan,T.B.; and Bauer,W.D. 1982."Early events in the infection of soybean by Rhizobium japonicum. Time course and cytology of the initial infection process."

Can.J.Bot.60:p.152-161.

27...Göttfer,M.;Hitz,S.;Hennecke,H. 1990. "Identification of nod S and nod U, two inducible genes inserted between the Bradyrhizobium japonicum nod YABC and nod IJ genes"

Molecular Plant-Microbe Interaction.3:p.308-316.

28...Hayo,C.J.;Cremers,C.;Spaink,H.P.;Wijfjes,A.H.M.;Pees,E.; Wijffelman,C.A.;Okker,R.J.H.;& Lugtenberg,B.J. 1989.

"Additional nodulation genes on the Sym plasmid of Rhizobium l.bv.viciae".

Plant Mol.Biol.13:p.163-174.

29...Honma,M.A.;Asomaning,M.; and Ausubel,F.M. 1990."Rhizobium meliloti nod D genes mediate host-specific activation of nod ABC."

J.Bact.172:p.901-911.

30...Horvath,B.;Bachem,C.W.B.;Schell,J.;7 Kondorosi,A. 1987.

"Host-specific regulation of nodulation genes in Rhizobium is mediated by a plant signal, interacting with the nod D gene product".

The EMBO Journal.6:p.841-848.

31...Horvath,B.;Kondorosi,E.;John,M.;Schmidt,J.;Tórok,I.; Györgypal,Z.;Barabas,I.;Wienecke,U.;Schell,J.;& Kondorosi,A. 1986."Organization, structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa".

Cell. 46:p.335-343.

32...Jeremy, J.W.; Michel, A.D.; C. Lucy, S.; Frank, B.D.; & Rolfe, B.G. 1988. "A molecular analysis of the host-range genes of Rhizobium trifolii".

Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. R. Palacios & D.P.S. Verma (eds). APS. PRESS.

33...Kondorosi, E.; Banfalvi, Z.; & Kondorosi, A. 1984. "Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti: identification of nodulation genes".

Mol. Gen. Genet. 193:p.445-452.

34...Kumarashinge, R.M.K.; and Nutman, P.S. 1977. "Rhizobium - stimulated callose formation in clover root hairs and its relation to infection."

J. Exp. Bot. 28:p.961-

35...Lang-Unnasch, N.; and Ausbel, F.M. 1985. "Nodule-specific polypeptides from effective alfalfa root nodules and from ineffective nodules lacking nitrogenase".

Plant Physiol. 77:p.833-839.

36...Lara, M.; Porta, H.; Padilla, J.; Folch, J.; and Sanchez, F. 1984. "Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in Phaseolus vulgaris L.".

Plant Physiol. 76:p.1019-1023.

37...Legocki, R.P.; and Verma, D.P.S. 1980. "Identification of nodule-specific host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium - legume symbiosis".

Cell. 20:p.153-163.

38...Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.;

Promé, J.C.; & Dénarié, J. 1990. "Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal".

Nature. 344:p.781-784.

39... Lewin, A.; Cervantes, E.; Chee-Hoong, W.; Broughton, W.J. 1990. "Nod SU, two new nod genes of the broad host range Rhizobium strain NGR 234 encode host-specific nodulation of the tropical tree Leucaena leucocephala"

Molecular Plant-Microbe Interaction. 3:p.317-326.

40... Long, S.R. 1984. "Genetics of Rhizobium nodulation. In Plant-Microbe Interactions".

Molecular and Genetic perspectives. 1: Kosuge, T. & Nester, E.W. (eds) Academic Press, N.Y.

41... Long, S.R.; Buikema, W.J.; & Ausbel, F.M. 1982. "Cloning of Rhizobium meliloti nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants".

Nature. 298:p.485-488.

42... Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; and Sambrook, J. 1982. "Molecular Cloning: A laboratory manual".

Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor laboratory Press.

43... Martínez, E.; Pardo, M.A.; Palacios, R. & Cevallos, M.A. 1985.

"Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris".

J. Gen. Microbiol. 131:p.1779-1786.

44... Martínez, E.; Romero, D.; & Palacios, R. 1990. "The Rhizobium genome".

Plant Sciences.2.p.59-93.

45...McIver, J.; Djordjevic, M.A.; Weinman, J.J.; Bender, G.L.; and Rolfe, B.G. 1989. "Extension of host range of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii caused by point mutations in nod D that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules."

Molecular Plant-Microbe Interactions.2:p.97-106.

46...Nash, J.H.E.; Ma, S.; and Iyer, V.N. 1989. "Characterization of Sym plasmids of Rhizobium leguminosarum strains able to nodulate Pisum sativum cv. Afghanistan."

Plant Mol. Biol. 11:p.427-432.

47...Newcomb, W. 1981. "Nodule morphogenesis and differentiation." Int. Rev. Cytol. Suppl. 13:p.247-

48...Noel, K.D.; Sanchez, A.; Fernandez, L.; Leemans, J.; and Cevallos, M.A. 1984. "Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions".

J. Bact. 158:p.148-155.

49...Pankhurst, C.E.; Hopcroft, D.H.; and Jones, W.T. 1987.

"Comparative morphology and flavolan content of Rhizobium loti induced effective and ineffective root nodules on Lotus species, Leucaena leucocephala, Carmichaelia flagelliformis, ornithopus sativus, and Clanthus puniceus".

Can. J. Bot. 65:p.2676-2685.

50...Palacios, R.; Quinto, C.; de la Vega, H.; Flores, M.; Fernandez, L.; Hernandez, M.; Ballado, T.; and Soberon, G. 1983. "General organization of nitrogen fixation genes in Rhizobium phaseoli."

Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interactions. Puhler

(edt). Berlin: Springer Verlag.

51... Pañaloza, V.A.; & Marquez, C. 1988. "Estudios bioquímicos y fisiológicos de cepas de Rhizobium loti aisladas de Leucaena esculenta".

Rev. Lat. Microb. 30:p. 341-350.

52... Pierce, M.; and Bauer, W.D. 1983. "A rapid regulatory response governing nodulation in soybean".

Plant Physiol. 73:p. 286-290.

53... Quinto, C.; dela Vega, H.; Flores, M.; Fernandez, L.; Ballado, T.; Soberon, G.; & Palacios, R. 1982. "Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli".

Nature. (London). 299:p. 724-726.

54... Ratet, P.; Schell, J.; & de Bruijn, F.J. 1988. "Mini-MuLac transposons with broad host-range origins of conjugal transfer and replication designed for gene regulation studies in Rhizobiaceae".

Gene. 62:p. 41-52.

55... Ridge, R.W.; and Rolfe, B.G. 1986. "Sequence of events during the infection of the tropical legume Macroptilium atropurpureum by the broad-host-range, fast-growing Rhizobium ANU240".

J. Plant Physiol. 122:p. 121-

56... Robertson, J.G.; and Lyttleton, P. 1982. "Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasma membranes, infection threads and peribacteroid membranes in root hairs and nodules of white clover."

J. Cell Sci. 58:p. 63-78

57... Rodriguez, Q.F.; Fernandez, B.M.; Banfalvi, Z.; Megias, M.; and

- Kondorosi, A. 1989. "Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences the efficiency of nodulation in strains RS1051 of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii." Molecular Plant-Microbe Interactions. 2:p.75-83.
- 58...Rosenberg, C.; and Hugnet, T. 1984. "The pATC53 plasmid of Agrobacterium tumefaciens is not essential for tumor induction". Mol.Gen.Genet. 196:p.533-536.
- 59...Sanchez, F.; Campos, F.; Padilla, J.; Bonneville, J-M.; Enriquez, C.; and Caput, D. 1987. "Purification, cDNA cloning, and developmental expression of the nodule-specific uricase from Phaseolus vulgaris L.". Plant Physiol. 84:p.1143-1147.
- 60...Schofield, P.R.; Djordjevic, M.A.; Rolfe, M.A.; Shine, J.; & Watson, J.M. 1983. "A molecular linkage map of nitrogenase and nodulation genes in Rhizobium trifolii". Mol.Gen.Genet. 192:p.459-465.
- 61...Simon, R.; Priefer, U.; and Pühler, A. 1983. "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria". Biotechnol. 1:p.784-791.
- 62...Southern, E.M. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". J.Mol.Biol. 98:p.503-517.
- 63...Spaink, H.P.; Wijffelman, C.A.; Okker, R.J.H.; and Lugtenberg, B.E.J. 1989. "Localization of functional regions of the Rhizobium nodD product using hybrid nod D genes." Plant Mol.Biol. 12:p.59-73.

64...Spaank, H. P.; Wijffelman, C. A.; Pees, E.; Okker, R. J. H.; and Lugtenberg, B. J. J. 1987. "Rhizobium nodulation gene nod D as a determinant of host specificity".

Nature. 328:p.337-340.

65...Surin, B. P.; & Downie, J. A. 1989. "Rhizobium leguminosarum genes required for expression and transfer of host specific nodulation".

Plant Mol. Biol. 12:p.19-29.

66...Surin, B. P.; & Downie, J. A. 1988. "Characterization of the Rhizobium leguminosarum genes nod L M N involved in efficient host-specific nodulation".

Molecular Microbiology. 2:p.173-183.

67...Surin, B. P.; Watson, J. M.; Hamilton, W. D. O.; Economou, A.; & Downie, J. A. 1990. "Molecular characterization of the nodulation gene, nod T, from two biovars of Rhizobium leguminosarum".

Molecular Microbiology. 4:p.245-252.

68...Thummler, F.; and Verma, D. P. S. "Nodulin-100 gene of soybean codes for nodule-specific sucrose synthetase".

Third International Symposium on the Molecular genetics of Plant-Microbe Interactions. Brisson, N. and Verma, D. P. S. (eds).

69...Truchet, G.; Debelle, F.; Vasse, J.; Terzaghi, B.; Garnerone, A.-M.; Rosenberg, C.; Batut, J.; Maillet, F.; and Denarie, J. 1985.

"Identification of a Rhizobium meliloti pSym 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation."

J. Bact. 164:p.1200-1210.

70...Verma, D. P. S.; and Bal, A. K. 1976. "Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in roots nodules".

P.N.A.S. (USA). 73:p.3843-3847.

71...Ward, L.J.H.; Rockman, E.S.; Ball, P.; Jarvis, B.D.W.; & Scott, B. 1989. "Isolation and characterization of a Rhizobium loti gene required for effective nodulation of Lotus pedunculatus".
Molecular Plant-Microbe Interaction. 2:p.224-232.

72...Watson, J.M.; and Schofield, P.R. 1985. "Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in Rhizobium trifolii".
Mol.Gen.Genet. 199:p.279-289.

73...Zaat, S.A.J.; Schripsema, J.; Wijffelman, C.A.; van Brussel, A.N.; and Lugtenberg, B.J.J. 1989. "Analysis of the major inducers of the Rhizobium nod A promoter from Vicia sativa root exudate and their activity with different nod D genes."
Plant Mol.Biol. 13:p.175-188.

Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain CIAT899

C. Vargas,¹ L. J. Martinez², M. Megias¹ and C. Quinto^{2*}

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla, Apartado Postal 874, 41003 Sevilla, Spain.

²Unidad de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal, UNAM Apartado Postal 2-246, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Summary

Rhizobium leguminosarum biovar *phaseoli* type II strain CIAT899 nodulates a wide range of hosts: *Phaseolus vulgaris* (beans), *Leucaena esculenta* (leucaena) and *Macroptilium atropurpureum* (siratro). A nodulation region from the symbiotic plasmid has been isolated and characterized. This region, which is contained in the overlapping cosmid clones pCV38 and pCV117, is able to induce nodules in beans, leucaena and siratro roots when introduced in strains cured for the symbiotic plasmid, pSym. In addition, this cloned region extends the host range of *Rhizobium melliloti* and *R. leguminosarum* biovar (bv.) *trifolii* wild-type strains to nodulate beans. Analysis of constructed subclones indicates that a 6.4 kb *HindIII* fragment contains the essential genes required for nodule induction on all three hosts. *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strain CE3 nodulates only beans. However, CE3 transconjugants harbouring plasmid pCV3802 (which hybridized to a *nodD* heterologous probe), were capable of eliciting nodules on leucaena and siratro roots. Our results suggest that the CIAT899 DNA region hybridizing with the *R. melliloti* *nodD* detector is involved in the extension of host specificity to promote nodule formation in *P. vulgaris*, *L. esculenta* and *M. atropurpureum*.

Introduction

Symbiotic nitrogen-fixing bacteria have been classified into three genera: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium*.

Establishing a nitrogen-fixing symbiosis between the bacteria and the leguminous plants is a complex developmental process that involves the expression of symbiotic genes in both the host and the symbiont.

For *Rhizobium* species, the genes that control nodulation, host-range specificity and nitrogen fixation have been located on large indigenous plasmids called symbiotic plasmids (pSym) (Banfalvi *et al.*, 1981; Hombrecher *et al.*, 1981; Hooykaas *et al.*, 1981). In *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* species, the symbiotic genetic information lies on the chromosome (Noti *et al.*, 1985; van den Eede *et al.*, 1987).

The genes required in the earliest stages of the infection process are classified according to their properties when transferred into other species of rhizobia or into the related bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. The *nodABC* genes are involved in root hair curling and nodule induction. These genes are conserved between species both functionally and at the nucleotide level (Banfalvi *et al.*, 1981; Rossen *et al.*, 1984; Török *et al.*, 1984; Egelhoff *et al.*, 1985; Jacobs *et al.*, 1985). Tn5 insertions in the *nodABC* genes abolish the nodulation capacity of rhizobia (Rossen *et al.*, 1984; Török *et al.*, 1984; Djordjevic *et al.*, 1985; Egelhoff *et al.*, 1985; Jacobs *et al.*, 1985; Debelle *et al.*, 1986).

Downstream of *nodC*, in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Evans and Downie, 1986), *Rhizobium melliloti* (Long, 1989) and *Bradyrhizobium japonicum* (Nieuwkoop *et al.*, 1987; Hennecke *et al.*, 1988), two other genes are found: *nodI* and *nodJ*, which are functionally interchangeable with region II described for *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Djordjevic *et al.*, 1985). Mutations in *nodJ* genes (region II) have no effect in *B. japonicum* (Nieuwkoop *et al.*, 1987; Hennecke *et al.*, 1988). However, in *R. leguminosarum* bv. *viciae* and bv. *trifolii* these mutations result in inefficient (delayed) nodulation on some hosts (Djordjevic *et al.*, 1985; Evans and Downie, 1986). The genes *nodABC/J* are referred to as 'common' *nod* genes because they can be replaced by the corresponding genes of other *Rhizobium* or *Bradyrhizobium* species without affecting the host range.

Other nodulation genes appear to be involved in host-range specificity and nodulation efficiency: the *nodFE*

genes, present in *R. meliloti* (also called *hsnAB*) (Horvath *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1987) and in *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Shearman *et al.*, 1986) and bv. *trifolii* (region III) (Djordjevic *et al.*, 1985); the *R. meliloti nodGH* genes (otherwise called *hsnCD*), which do not seem to have homology to any from other *Rhizobium* species (Rodríguez-Quinones *et al.*, 1987) and the *nodLMN* and *nodX* genes, which have been found only in the *R. leguminosarum* group (Surin and Downie, 1988; Davis *et al.*, 1988). More recently, *R. leguminosarum* bv. *viciae nodT* and *nodO*, and *R. meliloti nodPQ* genes have been described (Canter-Cremers *et al.*, 1989; Cervantes *et al.*, 1989; de Maagd *et al.*, 1989).

Finally, the only nodulation gene expressed constitutively, *nodD*, is highly conserved within *Rhizobium* spp. *nodD* is adjacent to *nodA*, but is transcribed in the opposite direction. In some rhizobia, only one copy of *nodD* is present (i.e. *R. leguminosarum* bv. *viciae* and bv. *trifolii*, or *Rhizobium* sp. NGR234) (Innes *et al.*, 1985; Shearman *et al.*, 1986; Bassam *et al.*, 1988) while other species carry two (*B. japonicum*, *R. spp.* MPIK3030 or *Rhizobium fredii*) (Ramakrishnan *et al.*, 1986; Horvath *et al.*, 1987; Göttfert *et al.*, 1989) or three copies of this gene (*R. meliloti*, Göttfert *et al.*, 1986).

The *nodD* gene product is a DNA-binding regulatory protein that induces other nodulation genes in the presence of flavonoid compounds found in root exudates (Mulligan and Long, 1985; Innes *et al.*, 1985). Moreover, it has been shown recently that the *nodD* gene also plays a role in host range, probably by mediating host-specific activation of *nod* genes (Horvath *et al.*, 1987; Spaink *et al.*, 1987; Bassam *et al.*, 1988; Györgypal *et al.*, 1988).

As described above, most detailed genetic studies have been carried out using the fast-growing, narrow host-range strains (*R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* and bv. *viciae*). Therefore, relatively little information has been acquired about *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Bacteria capable of eliciting nodules in *Phaseolus vulgaris* form a strongly heterogeneous group, as proposed on the basis of protein patterns (Roberts *et al.*, 1980), antibiotic resistance (Beynon and Josey, 1980), numerical taxonomy (Cateau *et al.*, 1984) and structure of chromosomal genes, showing a level of genetic and genotypic divergence greater than that for any single bacterial species (Piñero *et al.*, 1988).

Native isolates from *P. vulgaris* nodules differ in their nodulation host range and in nitrogenase (*nif*) copy number (Martinez *et al.*, 1985). 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 a single copy of the *nifH* gene (Martinez *et al.*, 1985; Palacios *et al.*, 1987).

When pSym from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strain

CE3 (type II) is transferred to *A. tumefaciens*, the transconjugants elicit the formation of non-nitrogen-fixing nodules on bean roots (Palacios *et al.*, 1985; Brom *et al.*, 1988). The reported promotion of nitrogen-fixing nodules in *P. vulgaris* and *Leucaena esculenta*, by *A. tumefaciens* transconjugants, was obtained by the transfer of pSym from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* type II, strains CFN299 and CIAT899 (Martinez *et al.*, 1987; Brom *et al.*, 1988).

So far, the genetic analysis of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* nodulation regions has been reported only for a limited number of type I strains (Lamb *et al.*, 1985; Cevallos *et al.*, 1989). In this paper we report the cloning and characterization of a symbiotic region from CIAT899, a type II strain of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. This pSym region includes the putative common *nod* genes and a fragment that extends the host range of a type I strain (CE3), as well as of different fast-growing rhizobia, to nodulate those legumes nodulated by type II strain CIAT899.

Results

Isolation of the nodulation region

R. leguminosarum bv. *phaseoli* CIAT899 carries two plasmids of 120 megaDaltons (MD) (plasmid 'a') and 215MD (plasmid 'b'). Plasmid 'b' has been identified previously by Brom *et al.* (1988) as being the symbiotic plasmid.

In order to isolate the nodulation region from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899, we constructed a cosmid bank of total DNA by using the broad-host range cosmid vector pVK102, as described in the *Experimental procedures*. The entire cloned bank was introduced in the pSyn-cured CIAT899 derivative, RSP900. The transconjugants were selected in minimal medium supplemented with tetracycline and rifampicin and used as inoculants on bean seedlings. Plants were analysed for the presence of root nodules after 21 days. Single nodules were collected from each nodulated plant and bacteria were reisolated on TY medium with added tetracycline and rifampicin. Plasmid DNA was extracted from several of these clones and used to transform *Escherichia coli* HB101 to facilitate its further characterization. Cosmids pCV38 and pCV117 were isolated from these transformants (Fig. 1A). To confirm that these clones were responsible for the complementation, cosmids pCV38 and pCV117 were reintroduced into RSP900 and the transconjugants were tested once more on bean roots. Plants were fully nodulated within 21 days. Bean nodules induced by these transconjugants were not morphologically different from those induced by the wild-type strain CIAT899, although the plants presented a Fix⁻ phenotype (Fig. 2A and 2C). Nodules obtained in beans similar to those induced by

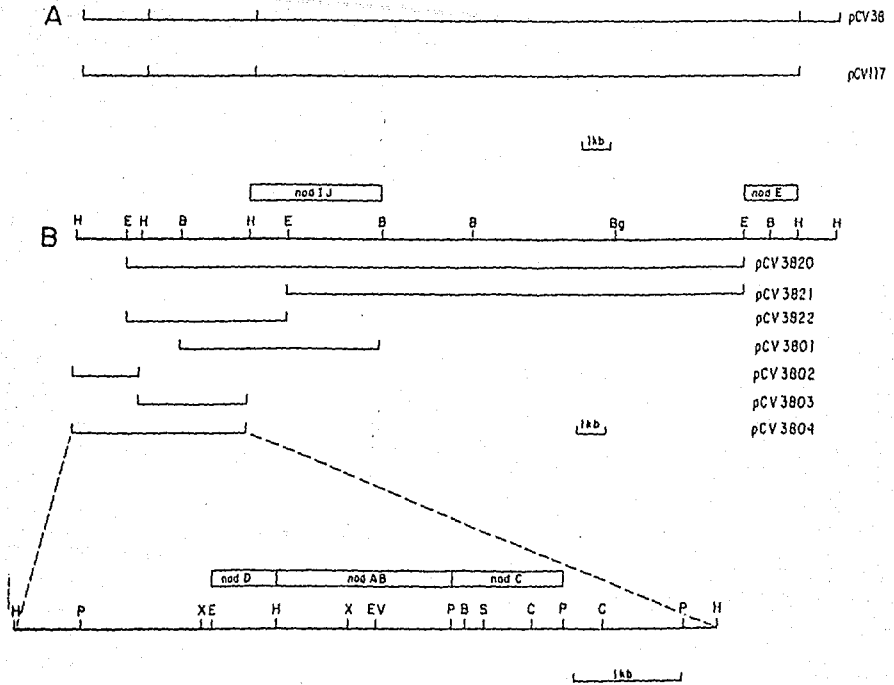


Fig. 1. DNA physical map of a symbiotic region from strain CIAT899.
A. *Hind*III restriction map of pCV38 and pCV117 cosmid clones.

B. The top of the Figure represents a detailed restriction endonuclease map of cosmid clone pCV38 and of the pCV38 subclone derivatives indicated below. The lower part presents an expanded map of the 6.4 kb *Hind*III fragment contained in pCV3804. Open boxes show the localization of restriction fragments which hybridized with heterologous *nod* probes. For details on DNA probes see the *Experimental procedures*. H, *Hind*III; E, *Eco*RI; B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; P, *Pst*I; X, *Xba*I; EV, *Eco*IV; S, *Sal*I; C, *Cla*I.

CIAT899 were found when either pCV38 or pCV117 was introduced into *A. tumefaciens* strain GM19023 (a plasmid-cured derivative of strain C58), *R. meliloti* strain 102F34 (wild type), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strain RS1051 (wild type), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strain RS1043 (a pSym⁻ derivatives of RS1051), and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CFN2001 (a pSym⁻ derivative of CFN42). A restriction map of cosmids pCV38 and pCV117 is shown in Fig. 1A. According to the map, these are overlapping cosmid clones which share three *Hind*III fragments (2.4, 4.0 and 21.0 kb).

Delimitation of the *nod* region

To locate more precisely the region that was able to complement the Nod⁻ phenotype of strain RSP900, six subclones were constructed (see the *Experimental pro-*

cedures) by using pRK404 (for *Hind*III and *Bam*HI subclones) and pSup205 (for subclones in *Eco*RI) as cloning vectors (Fig. 1B).

These subclones were transferred into RSP900 and tested for their ability to nodulate beans. Only pCV3804 was able to elicit nodule formation on bean seedlings (Fig. 2D). These nodules resembled those induced by strain CIAT899, but the nodule number was drastically reduced with respect to the wild-type strain, indicating that although the minimum amount of cloned DNA needed to complement RSP900 is represented in pCV3804, additional nodulation genes are present on pCV38. These results are illustrated in Fig. 2A, 2C and 2D.

For further definition of the organization of the putative *nod* genes contained in the cloned region, total CIAT899 and RSP900 DNA, as well as DNA from clones pCV38 and pCV3804, was digested with several restriction enzymes

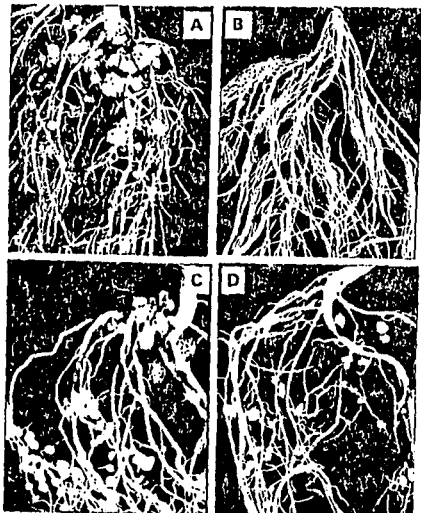


Fig. 2. Roots of *P. vulgaris* 21 days after inoculation with: (A) CIAT899 wild-type strain, (B) RSP900 (pSym-cured strain), (C) RSP900 carrying cosmid clone pCV38 and (D) RSP900 harbouring subclone pCV3804.

(see Fig. 1B), the fragments separated by agarose gel electrophoresis and then blotted onto nylon filters. Hybridizations with specific probes of *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *viciae* were conducted (see the *Experimental procedures*). When the *R. meliloti nodAB* probe was used, homology was found in a single 1.6 kb *HindIII-PstI* fragment, and the *R. meliloti nodC* probe exhibited a strong hybridizing signal with a 1.0 kb *PstI* band. A single band of 2.4 kb was detected when both total CIAT899 and pCV38 *HindIII*-restricted DNA was hybridized with the *nodD* probe. pCV38 was also doubly digested and a 0.6 kb *EcoRI-HindIII* fragment hybridized to the *nodD* heterologous probe (Fig. 3).

Hybridizations with *R. leguminosarum* bv. *viciae nodIJ* and *nodE* probes gave two bands: a 4.8 kb *HindIII-BamHI* and a 1.9 kb *EcoRI-HindIII*. The arrangement of these hybridizing fragments on pCV38 and pCV3804 clones is shown in Fig. 1B. As expected, in each case hybridizing fragments were represented in the CIAT899-digested total DNA, and absent in the pSym⁻-cured derivative, RSP900.

When these nodulating cosmids were hybridized using as a probe pCQ152, which carries a 300 bp sequence from the coding region of the *nifH* gene from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 (Quinto *et al.*, 1985), no hybridization signal was observed (data not shown). A 6.5 kb *HindIII*

fragment had been identified in a Southern blot of total *HindIII*-digested DNA from strain CIAT899 when probed with radioactively labelled pCQ152; no signal was obtained when this probe was hybridized to total restricted DNA from strain RSP900 (data not shown). These results indicated that the *nifH* gene is not included in the cloned nodulation region but is located elsewhere on the pSym of strain CIAT899.

Subclone pCV3804 was tested for its capability to extend the host range of *R. meliloti* 102F34 and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051 to nodulate *P. vulgaris*, and to complement the cured derivative strains RS1043, CFN2001 and GM19023. All the strains carrying pCV3804 were able to induce nodules on bean plants. Figure 4A-D shows the nodules induced in *Phaseolus* by *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051 (A), RS1043 (B), *R. meliloti* 102F34 (C) and *A. tumefaciens* GM19023 strains (D).

Identification of the region that carries host-range determinants

R. leguminosarum bv. *phaseoli* type II strains have a broad host range of specificity (Martínez *et al.*, 1985), including

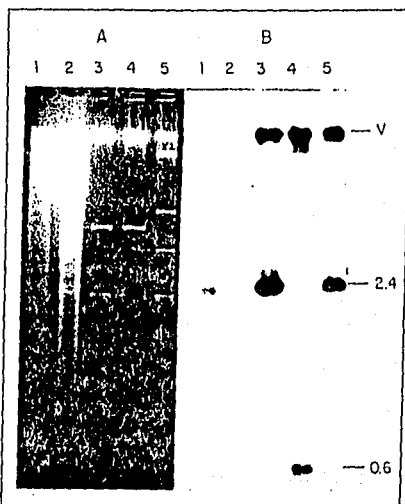


Fig. 3. *nodD* hybridization pattern with total genomic DNA and the *nod* cloned region.

A. Ethidium bromide-stained electrophoretic patterns of: *HindIII* total genomic DNA digests from CIAT899 (1), RSP900 (2); and of pCV38 DNA restricted with *HindIII* (3), *HindIII-EcoRI* (4) and *HindIII-DamII* (5). B. Hybridization patterns of the above DNA samples against a *R. meliloti nodD* probe. Molecular weights are indicated on the right margin in kb. v, cloning molecular vehicle.

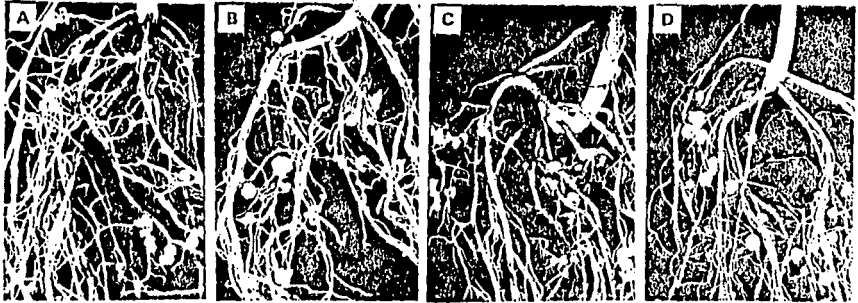


Fig. 4. Twenty-one-day-old nodules in *P. vulgaris* induced by subclone pCV3804 carried by different *Rhizobium* strains.
 A. *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051 (wild-type strain).
 B. *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1043 (RS1051 pSym-cured strain).
 C. *R. meliloti* 102F34 wild-type strain.
 D. *A. tumefaciens* GM19023.

other legumes besides *Phaseolus*, such as *L. esculenta* and *Macropodium atropurpureum*. *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains have a narrow nodulation host range (Martinez *et al.*, 1985; Palacios *et al.*, 1987) as is the case for strain CE3, which nodulates only beans.

In the results described above we have shown that a region from the CIAT899 pSym can extend the host-range nodulation of *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* to *Phaseolus* beans. We determined whether this CIAT899 cloned region also confers the capability to nodulate *L. esculenta* and *M. atropurpureum*. Therefore cosmids pCV38 and pCV117, as well as pCV38 derivatives, were transferred into *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CE3, RSP900, CFN2001 and *A. tumefaciens* GM19023 strains, and the transconjugants obtained were used to inoculate leucaena and siratro roots. The results obtained are summarized in Table 1 and in Figs 5 and 6: there was virtually no difference in nodulation in both plant species.

When the pSym⁻ strains, either RSP900 or CFN2001, were used as recipient, both pCV38 and pCV117 were able to maintain the broad host range exhibited by the parent strain CIAT899 (Table 1), although the nodulum number was lower (Fig. 6B). Moreover, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CE3, harbouring either pCV38 or pCV117, elicits small and poorly developed nodules on both host plants (Table 1 and Fig. 5C).

When either strain RSP900 or CFN2001, carrying pCV3804, was inoculated on to leucaena and siratro roots, nodule-like structures were observed. In addition, as with strain CIAT899, strain CE3 carrying pCV3804 nodulated *L. esculenta* (Fig. 5D) and *M. atropurpureum*, but the nodulum number was reduced relative to the wild-type strain.

On the other hand, mobilization of pCV38, pCV117 or pCV3804 into *A. tumefaciens* GM19023 resulted in the formation of pseudonodules on leucaena and siratro roots.

Table 1. Symbiotic phenotype of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*: CE3 and RSP900 (CIAT899 pSym-cured strain), and *A. tumefaciens* GM19023 transconjugants harbouring recombinant clones on siratro and leucaena.

Introduced clone	Recipient Strain					
	CE3		RSP900		GM19023	
	Leucaena	Siratro	Leucaena	Siratro	Leucaena	Siratro
pCV38	+	+	+	+	+	+
pCV117	+	+	+	+	+	+
pCV3804	+	+	+	+	*	+
pCV3820	+	+	-	-	-	-
pCV3821	-	-	-	-	-	-
pCV3822	+	+	-	-	-	-
pCV3801	-	-	NT	NT	NT	NT
pCV3802	+	+	NT	NT	NT	NT
None	-	-	-	-	-	-

a. NT, not tested.

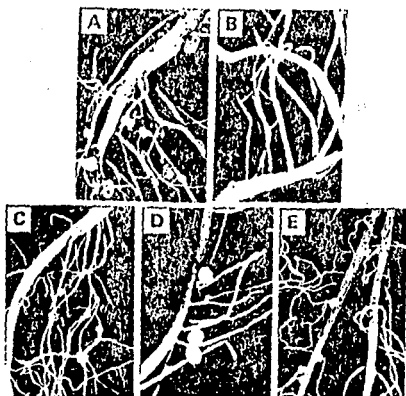


Fig. 5. Nodules formed in *L. esculenta* by *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*: (A) CIAT899, (B) CE3; CE3 transconjugants harbouring pCV3820 (C), pCV3804 (D) and pCV3802 (E). (See Fig. 1B.)

Strains GM19023 or RSP900, carrying any of the other subclones shown in Fig. 1B, failed to nodulate *Macroptilium* and *Leucaena* roots.

Among the pCV38 subclones examined for the ability to induce nodules on a CE3 background, only pCV3820, pCV3822 and pCV3802, besides pCV3804, were able to extend the host range of this strain to nodulate leucaena and siratro (Table 1). Nodules elicited by pCV3820 were similar in external appearance to those induced by the wild-type strain. Subclones pCV3822 and pCV3802 preserved the ability to induce nodule structures on *L. esculenta* and *M. atropurpureum*, although there were smaller and fewer nodules as compared to those induced by subclone pCV3820. These results suggest that the information required for host-range extension of strain CE3, to nodulate leucaena and siratro, is found within the 0.6 kb *EcoRI-HindIII* fragment in pCV3802 (Fig. 1B). This fragment is part of pCV3822 and pCV3802 and both of them were able to extend the nodulation abilities of strain CE3 (Table 1).

As demonstrated above, subclone pCV3804 could confer bean-nodulation ability to both *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* wild-type strains, thus it was of interest to know whether the 0.6 kb *EcoRI-HindIII* region that hybridized with the heterologous *nodD* probe was also responsible for this host-range extension to *Phaseolus* beans. Subclones pCV3820, pCV3821, pCV3822, pCV3801 and pCV3802 (see Fig. 1B), were mobilized into *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051 strain and transconjugants were analysed for their nodulation phenotype on *P. vulgaris* (Table 2).

R. leguminosarum bv. *trifolii* strain RS1051 derivatives, harbouring subclones pCV3820, pCV3822 or pCV3802, were able to induce nodulation on *Phaseolus* beans. These subclones have in common only the 0.6 kb *EcoRI-HindIII* fragment, suggesting that this region is also essential for extension of host range to bean plants. One of these transconjugants, RS1051, carrying pCV3802, did not induce nodulation on *M. atropurpureum* and *L. esculenta*, in spite of the fact that pCV3802, when introduced into strain CE3, nodulates both plants (data not shown).

Discussion

The bacterial molecular genetics of nodulation have been analysed in most detail in *R. meliloti* and in the biovars *trifolii* and *viciae* of *R. leguminosarum*. In all three, the nodulation genes are linked to *nif* genes (Long, 1984) and are clustered in a relatively small D:IA region. In the two biovars of *R. leguminosarum*, *nod* genes are arranged contiguously, and thus the transfer of relatively small regions of cloned *nod* DNA from bv. *trifolii* or *viciae* to other species of *Rhizobium* conferred on the recipient the ability to nodulate clover or peas, respectively (Downie et al., 1983; Schofield et al., 1984). In *R. meliloti* 41, however, the *nod* genes are in two groups, separated by about 6 kb (Kondoroski et al., 1984; Horvath et al., 1986). In *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* type I (strain CE3), two



Fig. 6. Twenty-one-day-old nodules in *L. esculenta* induced by *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* pSym-cured strains and *A. tumefaciens* carrying pCV38 and pCV3804 clones. A, C, CFH2001 harbouring pCV38 and pCV3804 clones, respectively. B, RSP900 carrying pCV38. D, *A. tumefaciens* GM19023 containing subclone pCV3804.

Table 2. Nodulation phenotypes in *P. vulgaris* of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051 transconjugants bearing recombinant clones of the isolated *nod* region.

Introduced in strain RS1051	Nodulation phenotype in <i>P. vulgaris</i>
pCV3820	+
pCV3821	-
pCV3822	+
pCV3801	-
pCV3802	+

regions from the Sym plasmid are essential to restore the ability to induce non-nitrogen-fixing modules on *P. vulgaris* (Cevallos *et al.*, 1989). These data, taken together with those published by Lamb *et al.* (1985) and recent data of our group (M. Vázquez, personal communication), suggest that in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains there are at least two separate regions within the pSym that are required for nodule induction and development. Whereas strain CE3 (type I) nodulates only beans, CIAT899 is able to infect not only its original host, *P. vulgaris*, but also other legumes including *L. esculenta* and *M. atropurpureum*. Complementation analysis of pSym-cured strains indicate that, in contrast to those results obtained for CE3, strain CIAT899 has only one region that contains information required for the nodulation of all three leguminous plants. This is in accordance with the already reported data supporting the great divergence existing between types I and II of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strains (Piñero *et al.*, 1988).

Within this CIAT899 pSym cloned region, comprising overlapping cosmid clones pCV38 and pCV117, homology to heterologous *nod* detectors (*nodA*B, *nodC*, *nodD*, *nodJ* and *nodE*) has been found. Our data indicate that the arrangement of the putative common *nod* genes in CIAT899 strain is similar to that found in *R. meliloti* and in bv. *trifolii* and bv. *viciae* of *R. leguminosarum* (Martínez *et al.*, 1990). Hybridization to the *R. meliloti* *nodD* probe revealed a single band, which was adjacent to the presumed *nodABC* genes, in an equivalent position to that found in other rhizobia. However, the region that did hybridize with the *nodE* detector was located about 19 kb from the presumptive *nodABC* genes, which is an unusually large distance compared to other fast-growing *Rhizobium* strains (Martínez *et al.*, 1990). It has been reported that the induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kb of DNA from the *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Sym plasmid (Innes *et al.*, 1988). The clone carrying this region includes all known nodulation genes of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843, the nitrogenase structural genes *nifHDK* and, in addition, regions homologous to *fixABC*, *nifA*, *nifB*, *nifE* and *nifN* genes of other

nitrogen-fixing bacteria. None of the isolated cosmids obtained by positive complementation of pSym-cured strain RSP900 was able to induce nitrogen-fixing nodules on bean roots; therefore, there are additional regions within the symbiotic plasmid, outside the region cloned on pCV38, that are indispensable for induction of nitrogen-fixing nodules on beans. By extensive complementation experiments in CE3, RSP900 or CFN2001 strains, with subcloned regions, we have found that the *nod* genes present on subclone pCV3804 are sufficient to elicit nodulation on all three legume hosts. None of the other assayed pCV38 subclones in a pSym-cured strain was able to promote nodulation in any tested plant host (not even pCV3820 or pCV3822, which partially overlaps pCV3804 subclone). From these data it seems likely that the 1.8 kb *HindIII*-*EcoRI* fragment, located to the left of pCV3804 (absent in pCV3820 and pCV3822), is essential for nodulation of beans, leucaena and siratro roots. The bean-nodulation phenotype of plasmid-cured strains, harbouring subclone pCV3804, showed a significant reduction in the number of nodules formed as compared to wild-type or RSP900, carrying pCV38 cosmid clone. This may be due to the absence of one or more known genes or additional, as yet unidentified, genes. According to DNA hybridization experiments, it appears that genes analogous to *R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodJ* and *nodE* genes are located on pCV38, outside the pCV3804 cloned region. Previous reports have shown that mutations in *nodJ* lead to a delayed nodulation phenotype (Djordjevic *et al.*, 1985; Evans and Downie, 1986), while the *nodE* gene is involved in host-range specificity (Shearman *et al.*, 1986). Based on these data, it seems unlikely that the phenotype exhibited by RSP900 transconjugants is due to the absence of sequences homologous to *nodJ* or *nodE* genes. It may be possible that pCV3804 does not include other as yet unlocated *nod* genes. For instance, it has been reported that a mutation within *nodL* strongly reduced nodulation of peas, lens and *Lathyrus*, although it had a relatively small effect on the nodulation of *Vicia* species (Surin and Downie, 1989). We cannot exclude the participation of other genes such as *nodL*, for instance, present elsewhere on the cloned pCV38 cosmid. pCV38, pCV117 and pCV3804 were able to extend the host range of *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* and *A. tumefaciens* to nodulate *Phaseolus vulgaris*. Similar results have been reported when cloned nodulation regions of different species of *Rhizobium* were transferred to other recipient strains which acquired the nodulation phenotype of the donor strain, indicating that these genes carry all essential host-specificity functions (Schofield *et al.*, 1984; Hirsch *et al.*, 1985; Ramakrishnan *et al.*, 1986). Additionally we investigated whether these cloned regions may confer to *A. tumefaciens* GM19023 the ability to nodulate the same hosts as wild-type strain CIAT899. In contrast to the

Rhizobium species analysed, *A. tumefaciens* transconjugants only induced pseudonodules on leucaena and siratro.

Transfer of pCV38, pCV117 or pCV3804 clones to the *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CE3 resulted also in the extension of its host-range abilities to nodulate both leucaena and siratro roots. An interesting feature was the fact that the external appearance of the nodules formed on inoculated plants was dependent on the bacterial background examined. For instance, CE3 transconjugants, containing cosmids pCV38 or pCV117, induced small white nodules in both tested plants (Fig. 5C); whereas nodules induced by pCV3804 CE3 transconjugants were large and well-developed. When the recipient was a pSym-cured strain (RSP900 or CFN2001) we found the opposite phenotype: pCV38 or pCV117 transconjugants elicited large, well-developed nodules while only pCV3804 was able to induce the same structures as those induced by CE3 transconjugants carrying pCV38 or pCV117 clones. This suggests that genetic information contained in strain CE3, but absent from cured strains, interferes with the ability of pCV38 or pCV117 to nodulate unusual hosts, such as leucaena and siratro. This conclusion is supported by results of several studies achieved in *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* and bv. *viciae* (Djordjevic *et al.*, 1985; Debellé *et al.*, 1986; Spaink *et al.*, 1987; Surin and Downie, 1989).

Our results clearly show that the minimum amount of cloned DNA needed to extend the host range of type I CE3 strain to nodulate leucaena and pCV3822 were able to extend the narrow host-range of CE3 strain to both plants, it is likely that the gene(s) required for the extension of specificity may be located on the overlapping *EcoRI*-*HindIII* fragment of both subclones. This band has been shown to hybridize to an *R. meliloti nodD* probe. The same region was also found to extend the host range of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* to nodulate beans. A preliminary qualitative assay to examine whether the region cloned into pCV3802 contains a functional *nodD* (or 'nodD-like') gene was performed. pCV3802 was mobilized into CFN2001 bearing a *nodA-lacZ* *R. leguminosarum* bv. *viciae* fusion (pMPI54) (Zaat *et al.*, 1987). Transconjugants obtained were able to induce β -galactosidase activity in the presence of inducer (120 nM naringenin), suggesting the presence of a *nodD*-like gene.

Finally, our data led us to propose that a ClAT899 putative *nodD* gene is involved in host-range specificity. Recent genetic evidence supports the notion that the *nodD* gene can be a determinant of host specificity, presumably as a result of its interaction with specific sets of flavonoids in a species-specific way (Horvath, *et al.*, 1988). Thus it is likely that, in a similar manner to that of strain NGR234, the broad host-range strain *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* ClAT899 *nodD* gene might be able to

recognize inducer molecules from all three hosts (Bassam, *et al.*, 1988). However, further characterization is needed in order to determine the precise role of this presumed *nodD* gene. On the other hand, the possibility that other nodulation genes such as *nodJ* or *nodE*-like genes may influence the host-range specificity has not yet been eliminated. In this context, it is interesting to note that pCV3802 (containing the DNA region homologous to the *R. meliloti nodD* gene) could extend the host range of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RS1051 to nodulate beans but not to nodulate leucaena or siratro. Our results support the latter assumption.

Experimental procedures

Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 3.

Media and bacterial growth conditions

Rhizobium strains were grown at 20°C in TY (Beringer, 1974) or PY (Noel *et al.*, 1984) media. *Escherichia coli* and *A. tumefaciens* cultures were grown in Luria-broth medium (Miller, 1972) at 37°C and 28°C, respectively. Minimal medium GGM, used for *Rhizobium* and *Agrobacterium*, contained (per litre) 1 g of NH₄Cl, 0.2 g of KH₂PO₄, 3 g of glucose, 2 g of sodium glutamate, 0.1 g of MgSO₄·7H₂O, 0.04 g of CaCl₂, 0.02 g of FeCl₃, 1 mg of biotin, 1 mg of thiamine, 1 mg of calcium pantothenate and 1 ml of micronutrient solution (per litre: 0.22 g of MnSO₄·4H₂O, 24 mg of CuSO₄·5H₂O, 3 mg of ZnSO₄, 18.6 mg of H₃BO₃ or 0.36 mg of Na₂MoO₄ and 2.5 g of ferric citrate).

Antibiotics were added to the following final concentrations (in $\mu\text{g ml}^{-1}$): kanamycin (Km), 30; chloramphenicol (Cm), 30; rifampicin (Rif), 50; tetracycline (Tc), 10; streptomycin (Sm), 100; ampicillin (Ap), 100; nalidixic acid (Nal), 10.

Enzymes and isotopes

DNA restriction endonucleases, T4 ligase and calf-intestinal alkaline phosphatase were purchased from either Boehringer Mannheim or Biolabs. All enzymes were used according to the manufacturers' instructions. Radioactive nucleotides were from Amersham International.

Matings and plasmid mobilization

In order to mobilize pVK102 and pRK404 clones from *E. coli* to *Rhizobium* and *A. tumefaciens*, triparental matings were carried out as described by Kondorosí *et al.* (1982), using pRK2013 as a helper plasmid. Mobilization of the pSup205 clones was done as described earlier (Cevallos *et al.*, 1989). Selection was on either GGM with Tc and Rif (for *A. tumefaciens*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*; RSP900 and CFN2001 strains, and *R. leguminosarum* bv. *trifolii*) or GGM with Tc and Nal for strain CE3 and *R. meliloti*.

Table 3. List of bacterial strains and plasmids used.

Plasmid or bacterial strains	Relevant characteristics	Source or reference
Bacterial strains		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>		
CIAT899	Wild-type; Nod ⁺ Fix ⁺ on beans	Martínez <i>et al.</i> (1965)
RSP900	Ril ^R derivative of CIAT899 cured of the pSym	This work
CE3	Sir ^R derivative of wild-type strain CFN42; Nod ⁺ Fix ⁺ on beans	Noel <i>et al.</i> (1984)
CFN2001	Ril ^R derivative of CFN42 cured of p42a and p42d plasmids	Palacios <i>et al.</i> (1963)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>		
RS1051	Ril ^R derivative of wild-type strain RS600; Nod ⁺ Fix ⁺ on clover	Rodríguez-Quilones <i>et al.</i> (1989)
RS1043	Ril ^R derivative of RS1051 cured of the symbiotic plasmid	Rodríguez-Quilones <i>et al.</i> (1989)
<i>R. meliloti</i>		
102F34	Wild-type; Nod ⁺ Fix ⁺ on alfalfa	Dylan <i>et al.</i> (1986)
<i>A. tumefaciens</i>		
GM19023	Plasmid-cured derivative (pAl ⁻ , Ti ⁻) of C58 strain	Rosenberg and Hughes (1984)
<i>E. coli</i>		
HD101	F ⁻ , <i>hsdS</i> , <i>hsdM</i> , <i>pro</i> , <i>lacY</i> , <i>gal</i> , <i>lacZ</i> , <i>rocA</i> , <i>Sm^r</i>	Boyer <i>et al.</i> (1986)
JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>Sm^r</i> (<i>lac pro</i>), F'(<i>traD38</i>), <i>proA^B</i> , <i>lacZ</i> M15	Messing (1983)
Plasmids		
pVK102	Km ^R , Tc ^R , cosmid derivative of pLARF1	Knaut and Nester (1982)
pSup205	Cos, Tc ^R , Cm ^R , ColE1	Simon <i>et al.</i> (1983)
pRK2013	Hm ^R , helper plasmid	Figurski and Helinski (1979)
pHC206	IncP1, Cb ^R , Km ^R	A. Pühler
pRK404	Plasmid derivative of pRK290	Diita <i>et al.</i> (1985)
pCV38	A 29 kb insert of the pSym plasmid of CIAT899 cloned into pVK102	This work
pCV117	A 27 kb insert of the pSym plasmid of CIAT899 cloned into pVK102	This work
pCV3820	A 22 kb insert of the pSym plasmid of CIAT899 cloned into pSup205	This work
pCV3821	A 16 kb <i>EcoRI</i> subclone from pCV3820 into pSup205	This work
pCV3822	A 6.2 kb <i>EcoPI</i> insert from pCV3820 subcloned into pSup205	This work
pCV3801	An 8 kb <i>DamI</i> fragment from pCV38 subcloned into pRK404	This work
pCV3802	A 2.4 kb <i>HindIII</i> insert from pCV38 subcloned into pRK404	This work
pCV3803	A 4.0 kb <i>HindIII</i> fragment from pCV38 subcloned also into pRK404	This work
pCV3804	A <i>HindIII</i> partially digested pCV38 subcloned into pRK404 (carries 2.4 and 4 kb inserts)	This work

Nucleic acid procedures

Total genomic DNA, large and mini-scale plasmid and cosmid DNA preparations were done as described elsewhere (Maniatis *et al.*, 1982; Rodríguez-Quinones *et al.*, 1987). DNA subcloning and bacterial transformation were performed according to Maniatis *et al.* (1982). Plasmid and genomic DNA were digested with restriction enzymes, fractionated by agarose gel electrophoresis, and transferred to nylon filters (Amersham International) as described by Southern (1975). Radio-actively labelled DNA was prepared by nick translation (Maniatis *et al.*, 1982) or by the multiprime DNA-labelling system (Amersham International). Specific activities of 10^7 – 10^8 c.p.m. μg^{-1} were obtained. Hybridization conditions were as described (Maniatis *et al.*, 1982 or Rodríguez-Quinones *et al.*, 1987).

Construction of *R. leguminosarum* bv. phaseoli CIAT899 genomic library

R. leguminosarum bv. phaseoli CIAT899 genomic library was constructed in pVK102, a low copy-number and broad host-range cosmid which can replicate in both *E. coli* and *Rhizobium*. CIAT899 DNA was partially digested with *Hind*III and DNA fragments in the size range of 25–35 kb were separated in sucrose gradients and cloned into pVK102 vector, which had been linearized with *Hind*III restriction enzyme. The ligation mix was packed *in vitro* into bacteriophage lambda heads and finally transduced into *E. coli* HB101. Out of 2000 Tc transductants, 30 colonies were analysed and all proved to have inserts of a mean size of 30 kb, which guarantee a 99.8% probability of finding a given sequence in the bank (Clark and Carbon, 1979).

Heat curing of plasmids

Kanamycin-sensitive CIAT899 strains were obtained from CIAT899 derivatives carrying Tn5-mob, after various subcultures at 42°C. A pSym-cured strain was isolated (RSP900).

Plasmid visualization

Plasmids profiles in *A. tumefaciens* and *Rhizobium* strains were analysed by the Eckardt procedure (1978).

Isolation of specific gene detectors for nodulation genes

Gel-purified DNA fragments were used as probes. *nodAB*, *nodC* and *nodD* detectors were from *R. meliloti* strain 41: the *nodAB* probe was a 1.5 kb *Eco*RI fragment from pJS204 (Schmidt *et al.*, 1984); the *nodC* probe was a 1.8 kb *Eco*RI fragment contained within pJS209 (John *et al.*, 1985), and a 0.35 kb *Av*II–*Bgl*II fragment of pKSK5 clone was used as a *nodD* internal probe (Schmidt *et al.*, 1984). *R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodJ* probe was a 3.2 kb fragment obtained by *Eco*RI digestion of plasmid pJ1271 (Evans and Downie, 1986). The *R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodE* detector was a 1.5 kb *Eco*RI–*Cla*I fragment from plasmid pJ1216 (Shearman *et al.*, 1986).

Plant tests and acetylene reduction assays

Surface-sterilized and germinated seeds of *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, *M. atropurpureum* and *L. esculenta* were inoculated with

one millilitre of a saturated liquid culture of the appropriate *Rhizobium* or *Agrobacterium* strain and grown in pots with vermiculite and Fehraeus solution. Plants were maintained in a growth cabinet with 16 h daylength at 25°C. After 20 d incubation, nodulation was observed and nitrogenase activity was tested by measuring the reduction of acetylene by gas chromatographic analysis (Masterson and Murphy, 1980).

Reisolation of bacteria from nodules was done according to Cevallos *et al.* (1989).

Acknowledgements

The authors are grateful to O. Santana and A. Pichardo for technical assistance, M. Vázquez and A. de las Peñas for excellent experimental advice, and F. Sánchez, L. Segovia and E. Martínez for critical reading of the manuscript. We also thank J. Padilla for help with computing. We thank A. J. Downie for providing plasmids pJ1216 and pJ1271, J. Schmidt for the gift of plasmids pJS204 and pJS209, F. Rodríguez-Quinones for vector pVK102, and A. Pühler for providing pNC206. This work was supported, in part, by grants from DGICYT, Spain, (PB85/0360), Instituto de Cooperación Iberoamericana M. de E., Spain, the US National Academy of Sciences/National Research Council (BNC-MX-68777), and the EEC (C11-0105-MEX), C.V.M. and L.J.M. were supported by an FPI(MdeEc) fellowship from Spain and a CONACYT/México fellowship, respectively.

References

- Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I., and Kondorosi, A. (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184: 318–325.
- Bassam, B.J., Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M., and Rolfe, B. (1988) Identification of a *nodD*-dependent locus in the *Rhizobium* strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes. *Mol Plant Micro Interact* 1: 161–168.
- Böringer, J.E. (1974) R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120: 421–429.
- Beynon, J.L., and Josey, D.P. (1980) Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J Gen Microbiol* 118: 437–442.
- Boyer, H.S., and Rouland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41: 459–472.
- Brewin, N.J., Beinger, J.E., and Johnston, A.W.D. (1980) Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120: 413–420.
- Bron, S., Martínez, E., Dávila, G., and Palacios, R. (1988) Narrow and broad host-range plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* 54: 1829–1833.
- Garner-Cremers, H.C.J., Spaik, H.P., Wijffjos, A.H.M., Pees, E., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H., and Lugtenberg, B.J.J. (1989) Additional nodulation genes on the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Plant Mol Biol* 13: 163–174.
- Catteau, M., Khanak, H., Legrand, M.D., and Guillaume, J. (1984) Contribution to the study of *Rhizobium* and *Agrobacterium* genus: numerical taxonomy. In *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Veeger, C., and Newton, W.E. (eds). The Hague: Nijhoff, Junk and Pudoc Publishers, pp. 330.

- Cervantes, E., Sharma, S.B., Maillet, S., Vasse, J., Truchet, G., and Rosenberg, C. (1989) The *Rhizobium meliloti* host-range *nodQ* gene encodes a protein which shares homology with translation elongation and initiation factors. *Mol Microbiol* 3: 745-755.
- Cevallos, M.A., Vázquez, M., Dávalos, A., Espín, G., Sepúlveda, J., and Quinto, C. (1989) Characterization of *Rhizobium phaseoli* Sym plasmid regions involved in nodule morphogenesis and host-range specificity. *J Mol Microbiol* 3: 879-889.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1979) Selection of specific clones from colony banks by suppression of complementation tests. *Meth Enzymol* 68: 396-408.
- Davis, E.O., Evans, I.J., and Johnston, A.W.B. (1988) Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol Gen Genet* 212: 531-535.
- Debellé, F., Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martinez, E., Denarié, J., and Truchet, G. (1986) Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 168: 1075-1086.
- De Maagd, R.A., Wijffels, A.H.M., Spalk, H.P., Ruiz-Saenz, J., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H., and Lugtenberg, B.J.J. (1989) *nodA*, a new *nod* gene of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Sym plasmid pRL1J1, encodes a secreted protein. *J Bacteriol* 171: 6764-6770.
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X.-W., Finlay, D.R., Guiney, D., and Helinski, D.R. (1985) Plasmid related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13: 149-153.
- Djordjevic, M.A., Schofield, P.R., and Rolfe, B.G. (1985) Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. *Mol Gen Genet* 200: 463-471.
- Downie, J.A., Hombrecher, G., Ma, Q.-S., Knight, C.D., Wells, B., and Johnston, A.W.B. (1983) Cloned nodulation genes of *Rhizobium leguminosarum* determined host-range specificity. *Mol Gen Genet* 190: 359-365.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, L., Kashynp, C., Douglas, C., Ynolfsky, M., Nester, E., Helinski, D.R., and Ditta, G. (1986) *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4403-4407.
- Eckardt, T. (1978) A rapid method for the identification of plasmid DNA in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.
- Egelhoff, T.T., Fisher, R.F., Jacobs, T.W., Mulligan, J.T., and Long, S.R. (1985) Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* 1021 nodulation genes: *nodD* is read divergently from *nodABC*. *DNA* 4: 241-248.
- Evans, I.J., and Downie, J.A. (1980) The *nodI* gene product of *Rhizobium leguminosarum* is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the *nodI* and *nodJ* genes. *Gene* 43: 95-101.
- Figurski, D.H., and Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK 2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1648-1652.
- Fisher, R.F., Swanson, J.A., Mulligan, J.T., and Long, S.R. (1987) Extended region of nodulation genes in *Rhizobium meliloti* 1021. II. Nucleotide sequence, transcription start sites and protein products. *Genetics* 71: 191-201.
- Göttfert, M., Horvath, B., Kondorosi, E., Putnoky, P., Rodriguez-Quinones, F., and Kondorosi, A. (1986) At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation on alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Mol Biol* 191: 411-420.
- Göttfert, M., Lamb, J.W., Gasser, R., Somanza, J., and Hennecke, H. (1989) Mutational analysis of the *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes and further *nod* box-linked genomic DNA regions. *Mol Gen Genet* 215: 407-415.
- Györgyfal, Z., Iyer, N., and Kondorosi, A. (1988) Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 212: 85-92.
- Hennecke, H., Meyer, L., Göttfert, M., and Fisher, H.M. (1988) Genetics of the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis: recent developments on genes for nodulation, bacteroid respiration and regulation of nitrogen fixation. In *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Verma, D.P.S., and Palacios, R. (eds) St Paul, MN: APS Press, pp. 118.
- Hirsch, A.M., Drake, D., Jacobs, T.W., and Long, S.R. (1985) Nodules are involved on alfalfa roots by *A. tumefaciens* and *R. trifolii* containing small segments of the *R. meliloti* nodulation region. *J Bacteriol* 161: 233-230.
- Hombrecher, G., Brewin, N.J., and Johnston, A.W.B. (1981) Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*. *Mol Gen Genet* 182: 133-136.
- Honma, M.A., and Ausubel, F.M. (1987) *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8538-8542.
- Hooykaas, P.J.J., van Brussel, A.N.N., den Dulk-Ras, H., van Slooter, G.M.S., and Schilperoort, R.A. (1981) Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291: 351-353.
- Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Török, I., Györgyfal, Z., Barabas, I., Wieneke, U., Schell, J., and Kondorosi, A. (1986) Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* 46: 335-343.
- Horvath, B., Bachem, C.W.B., Schell, J., and Kondorosi, A. (1987) Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J* 6: 841-848.
- Innes, R.W., Kuempel, P.L., Flazinski, J., Canter-Cremers, H., Rolfe, B., and Djordjevic, M.A. (1985) Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifolii*. *Mol Gen Genet* 201: 426-432.
- Innes, R.W., Hirus, M.A., and Kuempel, P.L. (1986) Induction of nitrogen-fixing nodule on clover requires only 32 kb pairs of DNA from the *Rhizobium trifolii* symbiosis plasmid. *J Bacteriol* 170: 3793-3802.
- Jacobs, T.N., Egelhoff, T.T., and Long, S.R. (1985) Physical and genetic map of a *Rhizobium meliloti* nodulation gene region and nucleotide sequence of *nodC*. *J Bacteriol* 162: 469-476.
- John, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schell, J. (1985) Expression of the nodulation gene *nodC* of *Rhizobium meliloti* in *Escherichia coli*: role of the *nodC* gene product in nodulation. *EMBO J* 4: 2425-2430.
- Knauf, V.C., and Nester, E.W. (1982) Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium Ti* plasmid. *Plasmid* 8: 45-54.
- Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C.E., Broughton, W.J., and Banfalvi, Z. (1982) Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet* 188: 433-439.
- Kondorosi, E., Banfalvi, Z., and Kondorosi, A. (1984) Physical and

- genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol Gen Genet* 193: 445-452.
- Lamb, J.W., Downie, J.A., and Johnston, A.W.B. (1985) Cloning of the nodulation (*nod*) genes of *Rhizobium phaseoli* and their homology to *R. leguminosarum nod* DNA. *Gene* 34: 235-241.
- Long, S.R. (1984) Genetics of *Rhizobium* nodulation. In *Plant-Microbe Interactions*. Kosuge, T., and Nester, E.W. (eds). *Molecular and Genetic Perspectives-Vol. 4*. New York: Academic Press, pp. 100-101.
- Long, S.R. (1989) *Rhizobium-legume* nodulation. Life together in the underground. *Cell* 56: 203-214.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R., and Cevallos, M.A. (1985) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J Gen Microbiol* 131: 1779-1786.
- Martínez, E., Palacios, R., and Sánchez, F. (1987) Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bacteriol* 169: 2828-2834.
- Martínez, E., Romero, D., and Palacios, R. (1990) The *Rhizobium* genome. *Critical Rev Plant Sci* 9: 59-93.
- Masterson, C.L., and Murphy, P.M. (1980) The acetylene reduction technique. In *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation*. Subba Rao, N.S. (ed.). London: Edward Arnold, pp. 8-33.
- Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Math Enzymol* 101: 20-73.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mulligan, J.T., and Long, S.R. (1985) Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6609-6613.
- Nieuwkoop, A.J., Banfalvi, Z., Deshmone, N., Gerhold, D., Schell, M.G., Sirotkin, K.M., and Stacey, G. (1987) A locus encoding short range is linked to the common nodulation genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 169: 2631-2638.
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., and Cevallos, M.A. (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon *Tn5* insertions. *J Bacteriol* 158: 148-155.
- Noti, J.D., Dudas, B., and Szalay, A.A. (1985) Isolation and characterization of nodulation genes from *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) strain Ifc78. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7379-7383.
- Palacios, R., Quinto, C., De la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Hernández, M., Ballado, T., and Soberón, G. (1983) General organization of nitrogen fixation genes in *Rhizobium phaseoli*. In *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interactions*. Pühler, A. (ed.). Berlin: Springer Verlag, pp. 164-168.
- Palacios, R., Flores, M., Martínez, E., and Quinto, C. (1985) Nitrogen fixation genes and DNA reiteration. In *Nitrogen Fixation Research Progress*. Veeger, C., and Newton, W.E. (eds). The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, pp. 173-179.
- Palacios, R., Flores, M., Brom, S., Martínez, E., González, V., Frenk, S., Quinto, C., Cevallos, M.A., Segovia, L., Romero, D., Garciarubio, A., Piñero, D., and Dávila, G. (1987) Organization of the *Rhizobium phaseoli* genome. In *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Verma, D.P., and Brisson, N. (eds). Montreal: Martinus Nijhoff Publishers, pp. 151-156.
- Piñero, D., Martínez, E., and Selander, R.K. (1988) Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Appl Environ Microbiol* 54: 2825-2832.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., Girard, H.L., Calva, E., and Palacios, R. (1985) Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1170-1174.
- Ramakrishnan, N., Prakash, R.K., Shantliram, S., Duteau, N.M., and Althery, A.G. (1986) Molecular cloning and expression of *Rhizobium lotii* USDA 193 nodulation genes: extension of host range for nodulation. *J Bacteriol* 168: 1087-1095.
- Roberts, G., Leys, W.T., Silver, L.E., and Brill, W.J. (1980) Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol* 39: 414-422.
- Rodríguez-Quinones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P., and Kondorosi, A. (1987) Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant Mol Biol* 8: 61-75.
- Rodríguez-Quinones, F., Fernández-Muriel, M., Banfalvi, Z., Megias, M., and Kondorosi, A. (1989) Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences that efficiency of nodulation in strain RS1051 of *Rhizobium leguminosarum* bv. *lotii*. *Mol Plant Micro Interact* 2: 75-83.
- Rosenberg, C., and Hugdel, T. (1984) The pATC53 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol Gen Genet* 196: 533-536.
- Rossen, L., Johnston, A.W.B., and Downie, J.A. (1984) DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes *nodAB* and *C* required for root hair curling. *Nucl Acids Res* 12: 9487-9508.
- Schmidt, J., John M., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Wieneke, U., Schröder, J., and Schell, J. (1984) Mapping of the protein coding region of *Rhizobium meliloti* common *nod* genes. *EMBO J* 3: 1705-1711.
- Scholfield, P.R., Ridge, R.W., Rolfe, B.G., Shine, J., and Watson, J.M. (1984) Host-specific nodulation is encoded on a 14 kb DNA fragment in *Rhizobium lotii*. *Plant Mol Biol* 3: 3-11.
- Shearman, C.A., Rossen, L., Johnston, A.W.B., and Downie, J.A. (1986) The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene *nodF* encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by *nodD* plus a factor in pea root exudate. *EMBO J* 5: 647-652.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Poes, E., Okker, R.J.H., and Lugtenberg, B.J.J. (1987) *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337-339.
- Surin, B.P., and Downie, J.A. (1989) Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* *nodL* gene involved in efficient host-specific nodulation. *Mol Microbiol* 2: 173-183.
- Surin, B.P., and Downie, J.A. (1989) *Rhizobium leguminosarum* genes required for expression and transfer of host specific nodulation. *Plant Mol Biol* 12: 19-29.
- Török, I., Kondorosi, E., Slepkowski, T., Postni, J., and Kondorosi, A. (1984) Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Nucl Acids Res* 12: 9509-9523.
- Van den Eede, G., Dreyfus, B., Goethals, K., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1987) Identification and cloning of nodulation genes from the stem-nodulating bacterium OR5571. *Mol Gen Genet* 206: 291-299.
- Zaai, S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Brussel, A.A.N., Okker, R.J.H., and Lugtenberg, B.J.J. (1987) Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Synn plasmid pRL1J1 by plant flavanones and flavones. *J Bacteriol* 169: 198-204.