

CFN 29
TD
1988
ej. 1



Universidad Nacional Autónoma de México

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

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS GENES QUE
 INTERVIENEN EN LA NODULACION DEL FRIJOL
 POR Rhizobium phaseoli.

T E S I S

Que para obtener el Título de
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

p r e s e n t a

MIGUEL ANGEL CARLOS CEVALLOS GAOS

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pg.
1. Presentación.....	4
2. Introducción.....	5
2.1 Los genes bacterianos y la nodulación de las leguminosas..	
2.1.1. El proceso.....	6
2.1.2. Los fenotipos simbióticos.....	7
2.1.3. Los genes comunes de nodulación.....	8
2.1.4. Los genes de nodulación específica.....	10
2.1.5. Exopolisacáridos y lipopolisacáridos.....	12
2.1.6. Papel de los genes <u>fix</u> y <u>nif</u> en la morfogénesis del nódulo.....	15
2.2 Notas.....	16
2.3 Bibliografía.....	17
3. Artículo.	
Characterization of <u>Rhizobium phaseoli</u> -Sym plasmid sequenses involved in nodule morphogenesis and host-range specificity.	
3.1 Abstract.....	24
3.2 Introduction.....	24
3.3 Materials and methods.....	25
3.3.1. Bacterial strains and plasmids.....	25
3.3.2. Bacterial crosses.....	25
3.3.3. Cloning procedures.....	25
3.3.4. Nodulation test and acetylene reduction activities.....	25
3.3.5. Re-isolation of bacteria from nodules.....	25
3.3.6. Microscopic examination of nodules.....	26
3.3.7. Isolation of specific gene detectors for common <u>nod</u> genes.....	26
3.3.8. Mobilization of cosmids to <u>Rhizobium</u>	26
3.3.9. Cosmid mutagenesis with MudII PR13.....	26
3.3.10. Preparation of Mu lysates.....	26
3.4 Results.....	27
3.4.1. Isolation of recombinant cosmids carrying <u>nif</u> and <u>nod</u> genes.....	27
3.4.2. Interfunctionality between the common <u>nod</u> genes of <u>R. phaseoli</u> and <u>R. meliloti</u>	27
3.4.3. Identification of nodulation genes by direct complementation on a Sym-cured strain.....	28
3.4.4. Definition of the sequences involved in nodulation.....	28
3.4.5. Localization of host-range genes.....	29
3.4.6. Nodule morphology.....	29
3.5 Discussion.....	30
3.6 References.....	32
3.7 Figure legends.....	36
3.8 Tables.....	41
4. Anexo.....	42

a Helena y Diego

PRESENTACION

El trabajo que presento como tesis doctoral esta organizado en dos secciones que se pueden leer de forma independiente o invirtiendo el orden sin que la comprensión del lector venga a menos. La primera sección intitulada "Los genes bacterianos y la nodulación de las leguminosas" , es una revisión actualizada de los genes nod que permite al lector no iniciado tener una panorámica del tema que le sirva como marco general para ubicar el artículo que esta a continuación. La segunda sección y parte medular de la tesis lleva por titulo "CHARACTERIZATION OF Rhizobium phaseoli -Sym PLASMID SEQUENCES INVOLVED IN NODULE MORPHOGENESIS AND HOST-RANGE SPECIFICITY". El objetivo principal de éste trabajo fué aislar y caracterizar el mínimo de secuencias genómicas que se requieren para que una cepa de Rhizobium phaseoli que ha perdido su plásmido simbiótico readquiera la capacidad de nodular raíces de frijol.

M.A.C.

LOS GENES BACTERIANOS Y LA NODULACION DE LAS LEGUMINOSAS

El propósito de la revisión que aquí presento es mostrar una panorámica actualizada de la función de todos aquellos genes de Rhizobium, Azorhizobium y Bradyrhizobium que participan en la inducción y morfogénesis de los nódulos en las leguminosas. En lo que se refiere a los genes que participan en la fijación de nitrógeno me limito a explicar el efecto que tienen las mutaciones en dichos genes en la morfogénesis del nódulo. Excluyo todas aquellas explicaciones sobre la mecánica de la fijación de nitrógeno, estando consciente que no hay una frontera entre la forma (morfogénesis del nódulo) y la función (fijación de nitrógeno). He procurado hacer cierto hincapié en los experimentos de transferencia de genes que le permiten adquirir a Agrobacterium tumefaciens propiedades simbióticas puesto que creo que es uno de los mejores sistemas para disectar en "bloques" de funciones la relación Rhizobium-leguminosa.

El nódulo es un órgano presente en las raíces de muchas leguminosas, que está especializado en fijar y asimilar nitrógeno (1). El nódulo sólo se desarrolla como consecuencia de la interacción simbiótica que se produce entre las células radiculares de una leguminosa y un grupo de bacterias del suelo clasificadas dentro de los géneros Rhizobium, Azorhizobium y Bradyrhizobium de la familia Rhizobiaceae (2).

Una especie de leguminosa solo puede desarrollar nódulos fijadores de nitrógeno con un número restringido de cepas bacterianas. En otras palabras, si una leguminosa no se encuentra con el huésped adecuado la interacción fracasa, el nódulo no aparece o su desarrollo se aborta.

Un nódulo funcional de cualquier leguminosa está formado por varios tipos celulares que, a grandes rasgos, podemos agrupar en células infectadas y no infectadas. Las primeras alojan en su interior a numerosos bacteroides rodeados cada uno de ellos o en pequeños grupos, por membranas peribacteroidales de origen vegetal. Los bacteroides son las bacterias especializadas en fijar nitrógeno y llegan a ser tantos que constriñen a los organelos vegetales a la periferia. Las células no infectadas incluyen aquellas que forman la corteza del nódulo, los haces vasculares, los meristemos y el tejido parenquimatoso que incluso se puede llegar a encontrar entre las células infectadas.

Los diferentes sistemas rhizobia-leguminosa presentan una gran variación en sus estrategias para construir un nódulo fijador de nitrógeno. Esta variación es palpable cuando se analizan las estructuras de los nódulos maduros que desarrollan las diversas especies de leguminosas. En general podemos clasificar a los nódulos en indeterminados y determinados. Los primeros, típicos de leguminosas de origen templado, mantienen siempre un meristemo; tienen un sistema vascular abierto que conecta el meristemo nodular con el sistema vascular de la raíz y

presentan células infectadas vacuoladas que contienen bacteroides individuales rodeados por membranas peribacteroidales. Estos nódulos suelen tener una forma cilíndrica. Los nódulos determinados son típicos de las leguminosas tropicales y se caracterizan por su forma esférica; su sistema vascular cerrado y un meristemo funcional transiente. También existe variación en los mecanismos por los cuáles las bacterias pueden penetrar en el tejido vegetal. uno de ellos es utilizando hilos de infección que describiremos mas adelante. el otro mecanismo, mucho menos estudiado, es el de la infección intertisial en el cuál las bacterias aprovechan la disrupción de la frontera física que representa la epidermis y el cortex de la raíz durante el surgimiento de una raíz secundaria para penetrar en el tejido vegetal (Rolfe y Gresshoff, 1988).

El nitrógeno fijado en los nódulos puede cubrir los requerimientos que tenga por éste elemento una leguminosa durante su ciclo de vida. Para que así ocurra se necesita que la planta suministre a los bacteroides el fotosintato suficiente para que obtengan la energía que requieren para que fijen nitrógeno y lo cedan en forma de amonio para que lo asimile la planta. La relación exige que ambas partes (la vegetal y la bacteriana) se diferencien para cumplir adecuadamente con la fijación y asimilación de nitrógeno.

El proceso

Los rhizobia pueden ocupar básicamente toda la superficie del sistema radicular de las leguminosas y pegarse preferentemente en los pelos radiculares pero solo la interacción simbiótica se inicia cuando algunas de las bacterias adecuadas entran en contacto con una zona susceptible de la raíz de su hospedero. Esta zona se localiza entre el ápice de la raíz y el pelo radical emergente mas pequeño (Bhuvaneshwari, et al. 1980). Generalmente los pelos radiculares pierden su capacidad de establecer simbiosis a medida que se diferencian. De acuerdo con lo demostrado para soya (Turgeon y Bauer, 1985.), los pelos radiculares que serán invadidos aún no han emergido de la raíz en desarrollo al tiempo del primer contacto bacteriano. La presencia de la bacteria causa que el pelo se deforme y se curve en la medida en que se desarrolla (Bauer, 1981). Los pelos radiculares llegan a desarrollar una deformación típica en forma de cayado de pastor, que en su parte interna atrapa una bacteria o un grupo de bacterias. Inmediatamente abajo del sitio de anclaje de la(s) bacteria(s) el hospedero deposita material propio de la pared celular de tal modo que la planta construye una estructura tubular llamada hilo de infección. Los rhizobia penetran uno a uno a traves del tubo mientras este crece. En el cortex de la raíz se organiza un meristemo que al dividirse y diferenciarse constituye el tejido nodular. El hilo de infección llega a la base del pelo radicular, atraviesa la pared celular y se bifurca varias veces dentro de las células adyacentes recién formadas. Las bacterias se liberan del hilo de infección en el interior de algunas de éstas células, pero quedan englobadas dentro de las

membranas peribacteroidales. En este momento las bacterias se diferencian en bacteroides e inician la fijación de nitrógeno. Concomitantemente la contraparte vegetal sintetiza una serie de proteínas específicas de la simbiosis llamadas nodulinas. El nódulo, generalmente, persiste hasta que la planta inicia la floración. No en todas las relaciones simbióticas la liberación de las bacterias al interior de la célula vegetal y su posterior diferenciación en bacteroides es un prerequisite para la fijación de nitrógeno. En el caso de la asociación Azorhizobium-Sesbania las bacterias nunca se liberan de los hilos de infección y la fijación de nitrógeno se lleva a cabo precisamente ahí en los hilos ahora llamados hilos de fijación de nitrógeno (Rolfe y Gresshoff, 1988).

La nodulación es un proceso compuesto de muchas etapas que ocurren en una secuencia lineal. Cada etapa se puede caracterizar por la acción de un grupo específico de genes tanto de la bacteria como de la planta que actúan en concierto bajo la coordinación de señales que se intercambian el hospedero y el microsimbionte. Se incluye entre las señales a inductores y metabolitos de bajo peso molecular y al contacto célula-célula. Para entender la naturaleza de la simbiosis se requiere descomponer el proceso simbiótico en tantas partes como sea posible, para luego identificar los genes, los productos y las señales propias de cada etapa. Para ello se requiere del aislamiento de huéspedes y hospederos que de algún modo tengan alterado el proceso simbiótico esperando que el proceso se haya detenido en un punto particular del desarrollo permitiendo así estudiarlo con detenimiento.

Dado que en la actualidad es más fácil manipular los genes bacterianos que los genes de origen vegetal, se ha preferido detener o desacoplar la organogénesis del nódulo usando bacterias modificadas genéticamente que plantas mutantes. Los microorganismos modificados se han construido siguiendo dos grandes estrategias, la primera se basa principalmente en el aislamiento de mutaciones por inserción de transposones que suprimen o alteran la interacción simbiótica. La segunda se basa en la adquisición de funciones simbióticas por la introducción de secuencias en plásmidos nativos o recombinantes a organismos otrora incapaces de nodular.

Los fenotipos simbióticos

En los inicios de la genética de los rhizobia se hizo una clasificación demasiado gruesa de los fenotipos simbióticos. En un principio todas las mutantes simbióticas se clasificaron en solo dos grupos, si la mutante era incapaz de nodular se le nominaba como Nod⁻ y si no podía fijar nitrógeno se le denominaba como Fix⁻, no importando si el problema era debido a un bloqueo temprano del desarrollo del nódulo más que a una falla directamente implicado en el aparato de fijación de nitrógeno. Hasta la fecha todavía hay poco trabajo en intentar correlacionar un determinado defecto genético con el efecto que causa en el del

desarrollo del nódulo, sobre todo a nivel molecular y de morfología fina.

Uno de los mejores sistemas para clasificar las mutaciones que alteran el proceso simbiótico es el propuesto por Sharon Long. En este sistema cualquier mutante simbiótica se les puede asignar alguno(s) de los siguientes fenotipos dependiendo en que punto se detenga la morfogénesis de nódulo (Long, 1984):

<u>Estadio</u>	<u>Codigo fenotipico</u>
Colonización del área radicular	Roc
Anclaje a la raíz	Roa
Deformación del pelo radicular	Had
Formación del cayado del pastor	Hac
Formación del hilo de infección	Inf
Inducción del nódulo	Noi
Desarrollo del nódulo	Ndv
Liberación bacteriana	Bar
Diferenciación de los bacteroides	Bad
Fijación de nitrógeno	Nif
Persistencia del nódulo	Nop

Los genes comunes de nodulación

A grandes rasgos, la secuencia de eventos que ocurren durante la infección, inducción y organogénesis del nódulo, es básicamente la misma para casi todos los rhizobia. Sin embargo, el proceso de nodulación es altamente específico, si un huésped no infecta al hospedero específico la nodulación no prospera, lo que apunta a la existencia de dos tipos de funciones, las que definen la especificidad del hospedero y aquellas que intervienen en las funciones básicas comunes de nodulación. De hecho se han localizado y aislado dos agrupaciones de genes que precisamente modulan estas funciones. En las bacterias del género Rhizobium ambas agrupaciones se encuentran junto con los genes de la nitrogenasa en un plásmido de alto peso molecular llamado plásmido simbiótico. Cuando este plásmido se pierde también se pierde toda capacidad de interacción con leguminosas. Si el plásmido simbiótico de una cepa de un determinado grupo de inoculación se transfiere a otra cepa de otro grupo de inoculación, la cepa receptora adquiere la propiedad de nodular

al hospedero de la cepa donadora. Lo mismo sucede si se usa como receptora a una cepa que haya perdido su plásmido simbiótico. Dentro de este género, quizá, la única excepción es el caso de Rhizobium loti donde los determinantes simbióticos parecen tener una localización cromosomal (Chua, et al. 1985). En el género Bradyrhizobium estos genes se encuentran en el cromosoma.

Dentro de las secuencias que habilitan a nodular a una cepa se encuentra un grupo de cuatro genes (nodABCD) organizados en dos operones que se transcriben en dirección opuesta nodABC por un lado y nodD por el otro. Las mutaciones en el operon nodABC bloquean completamente la respuesta simbiótica y tienen un fenotipo muy similar al de las cepas que han perdido su plásmido simbiótico (fenotipo, Had^- , Hac^- , Inf^- , Ndv^-) (Kondorosi et al. 1984) (Downie et al. 1985) (Wijffelman, et al. 1985) (Rosenberg, et al. 1986). La capacidad simbiótica se puede restaurar cuando se introducen los genes homólogos de una cepa de otro grupo de complementación, indicando que estos genes son esenciales para la nodulación y que son intercambiables entre los diversos grupos de complementación, de ahí que se les llame genes nod comunes.

La función de los productos de los genes nodABC aún se desconoce, pero se les ha relacionado con la formación del cayado del pastor y del hilo de infección. La localización de estos productos dentro de la célula bacteriana se desconoce en la mayor parte de los casos. Solo se sabe que el producto de nodC se encuentra en una posición transmembranal (Jacobs, et al. 1985) (John, et al. 1985). Anticuerpos dirigidos contra la fracción externa de esta proteína inhiben completamente la nodulación. Esta misma porción contiene una agrupación rica en cisteínas que se asemeja a los encontrados en receptores de ss la superficie celular de células de mamíferos, lo que podría indicar que el producto de nodC es un transductor de señales entre planta y bacteria (John, et al. 1988.) Por su parte, los productos de nodA y de nodD se encuentran en el citoplasma y asociados a la membrana interna (Schmidt, et al. 1986) (Lugtenberg, 1988).

El gene nodD a diferencia de los otros genes nod comunes puede encontrarse repetido varias veces dentro de un plásmido simbiótico (Rodríguez-Quifiones, et al. 1987). Las mutaciones que afectan al gene nodD tienen un fenotipo simbiótico que depende de la "especie" o del grupo de inoculación que las porte, por ejemplo, las mutaciones en el único gene que tienen R. leguminosarum y R. trifolii bloquean desde el inicio la nodulación (Downie, et al. 1985) (Schofield y Watson. 1985). En R. meliloti en donde existen dos copias funcionales de nodD, las mutaciones que afectan ambos genes causan un severo retraso en la nodulación (fenotipo Ndv^{del}) (3), sin embargo, el nódulo completa su organogénesis (Göttfert et al. 1986). En R. phaseoli la pérdida de todas las copias de nodD no afectan el desarrollo del nódulo (Trabajo adjunto).

El gene nodD se expresa constitutivamente en muchas especies excepto en R. leguminosarum donde el gene es autoregulatorio

(Rossen et al. 1985). Aunque se ha observado una expresión transiente de los genes nodABC durante el crecimiento normal de Rhizobium, La expresión de estos genes requiere de la presencia del producto de nodD y de sustancias específicas presentes en los exudados de la raíz. Estas sustancias son específicas para cada especie de leguminosa y se han identificado como flavonoides que se excretan preferentemente en la zona infectable de la raíz (Mulligan y Long. 1985) (Djordjevic et al. 1987) (Firmin et al. 1986). Como contraparte se han aislado una serie de compuestos que inhiben la inducción de los nodABC y que se excretan preferentemente en el límite de la zona infectable (Djordjevic et al 1987) (Firmin, et al 1986). El producto de nodD predicho en base en la secuencia de su gene muestra una zona de homología con el dominio de unión de ADN de la proteína regulatoria araC. La secuencia de los genes que se inducen con flavonoides ha permitido identificar en sus promotores una secuencia común llamada caja nod a partir de la cual se sospecha que el producto de nodD promueve su transcripción (Rostas, et al. 1986). Los productos de nodD pueden ayudar a definir la especificidad de la infección ya que la respuesta de cada producto de nodD frente a diferentes grupos de flavonoides es distinta. La mejor respuesta se obtiene de un modo especie específico (Spainck, et al, 1987.).

En R. leguminosarum y en B. japonicum además de los genes nodABC se han identificado dos genes más (nodI y nodJ) (Nieuwkoop, AJ. et al. 1987) (Downie, J.A. et al. 1985). En R. leguminosarum nodIJ se encuentran junto a nodABC en el mismo operón, y las mutaciones aisladas dentro de estos genes causan un retraso en la nodulación. En B. japonicum los genes nodIJ se encuentran separados de los nodABC y aún no se han aislado mutaciones en esta región. Los datos de secuencia de nodI muestran que este gene comparte homología con una serie de proteínas de la membrana interna de E. coli y Salmonella typhimurium que ligan ATP. El mismo tipo de datos predicen que nodJ es una proteína integral de membrana (Djordjevic, et al. 1987). Es posible que los productos de nodCIJ pertenezcan a un mismo sistema de proteínas asociadas a membrana (Rossen et al. 1987).

Los genes de nodulación específica.

Aparte de las secuencias antes descritas, existe otra región involucrada en la especificidad y en el desarrollo temprano del nódulo. Esta región incluye esencialmente a los genes nodEF. Las mutaciones que suprimen su acción impiden por una parte que la bacteria nodúle normalmente a su hospedero usual (fenotipo: Had^+ , Hac^+ , Inf^- , Ndv^{\ominus}) y por la otra hacen que sean capaces de formar cayados de pastor e iniciar de forma limitada hilos de infección en otras especies que no son sus hospederos usuales (fenotipo, Had^+ , Hac^+) (Debellé, et al. 1986). La función de estos genes no puede restaurarse introduciendo los genes homólogos provenientes de otras especies, La transferencia de nodEF de una especie a

otra causan que la cepa receptora adquiera la capacidad de nodular al hospedero de la cepa donadora (Horvath, et al. 1986) (Djordjevic et al. 1985).

En R. meliloti se han identificado dos genes mas involucrados en la determinación de la especificidad por el hospedero. Estos genes llamados nodG y nodH, no se les ha encontrado homólogos en otras especies de Rhizobium. Las mutantes en nodH no forman hilos de infección ni nódulos en alfalfa pero pueden inducir nódulos en dos especies de Vicia (Horvath, et al, 1986).

La secuencia de estos genes predice que el producto de nodF es una proteína acarreadora de grupos acilo ya que tiene un sitio de unión a pantotenato (Shearman, et al. 1986). Por su parte el producto de nodG tiene homología con una ribitol deshidrogenasa de Klebsiella pneumoniae lo que podría indicar que la planta le da a la bacteria un poliol como fuente de carbono (DeBelle y Sharma 1986).

Hay otros genes que participan en la determinación de la especificidad en algunas cepas de R. leguminosarum. Por ejemplo, las cepas convencionales de R. leguminosarum no pueden nodular a los chicharos Afghanistan (chicharos primitivos), sin embargo, la cepa TOM lo hace eficientemente gracias a la presencia de un gene nodX en su plásmido simbiótico. Este gene no tiene homólogos en las cepas convencionales (Hombrecher, et al. 1984).

Las cepas de amplio espectro, es decir aquellas que nodulan eficientemente mas de una leguminosa han organizado sus genes de especificidad de otro modo . El caso mejor estudiado es el de la cepa NGR234 que tiene la habilidad de nodular efectivamente a un amplio rango de leguminosas que incluye Macroptilium atropurpureum, Desmodium intortum, Vigna unguiculata, Lablab purpureus, Leucaena leucocephala. Tambien nodula inefectivamente a soya y a la no-leguminosa Parasponia andersonii. Esta cepa entre otras peculiaridades tiene en su plásmido simbiótico dos copias del operon nifHDK; un gene nodD; un gene nodC separado de los genes nodAB. Sus genes de especificidad los tiene organizados en tres regiones independientes no ligadas del plásmido simbiótico. Las tres regiones, llamadas HsnI, HsnII y HsnIII, son indispensables para que la cepa nodule a todas las leguminosas antes mencionadas. la región HsnI esta ligada al gene nodD; la región HsnII esta cerca de una de las copias de nifHDK y la región HsnIII esta en la misma zona que nodC (Nayudu y Rolfe, 1987) (Lewin etal, 1987).

Se han identificado por secuenciación otros genes que se presume tengan una función simbiótica. Por ejemplo en Rhizobium leguminosarum se encuentran junto a nodEF los genes nodL y nodM, este último presenta cierta homología con una amidofosforibosil transferasa pero a ninguno de los dos se les ha adjudicado alguna función simbiótica (Rossen et al, 1987). En un Bradyrhizobium sp. aislado de Parasponia, se ha encontrado un gene nodK entre

los operones nodD y nodABC del cual aún se desconoce su función. El gene nodK, al parecer, solo se encuentra en cepas de Bradyrhizobium.

Los genes comunes de nodulación y los de especificidad se encuentran cerca los unos de los otros en casi todas las especies de Rhizobium hasta ahora estudiadas. De hecho se han logrado aislar segmentos de aproximadamente 20 Kb. que contienen ambos grupos de genes. Estos segmentos al transferirse a cepas que han perdido su plásmido simbiótico permiten que las transconjugantes, logren, incluso formar nódulos con células infectadas. Esto implica que en el plásmido simbiótico residen pocos genes involucrados en la diferenciación del nódulo, sin embargo estos genes son conditio sine qua non de cualquier esbozo de interacción simbiótica (Schofield, et al. 1984.) (Göttfert et al. 1986) (Cevallos et al. Trabajo adjunto)

La transferencia de plásmidos simbióticos de Rhizobium a Agrobacterium tumefaciens confiere a este último cierta capacidad simbiótica que varía dependiendo de la especie que donó el plásmido. Si este proviene de R. meliloti, los nódulos que induce Agrobacterium en plantas de alfalfa son inefectivos y carecen de células infectadas normales. Las bacterias solo se encuentran en algunas de las células de las capas mas superficiales del nódulo ($Had^+, Hac^+, Inf^-, Ndv^+, Bar^-, Bad^-, Fix^-$) (Truchet, et al 1984) (Kondorosi, et al. 1982). El fenotipo simbiótico de las transconjugantes de Agrobacterium que portan plásmidos de R. phaseoli depende de la cepa donadora del plásmido. Por ejemplo, las transconjugantes que portan el plásmido simbiótico de la cepa RCC3622 inducen nódulos inefectivos en plantas de frijol (Ndv^+, Fix^-) (Hooykaas, et al. 1985), sin embargo, las que portan el plásmido de la cepa CFN299 inducen nódulos fijadores de nitrógeno ($Ndv^+, Bar^+, Bad^+, Fix^+$) (Martínez, et al. 1987). Lo anterior indica primero, que en R. meliloti existen otros genes involucrados en la morfogénesis del nódulo que se encuentran compartamentalizados en otros replicones diferentes del plásmido simbiótico. Segundo, que la compartimentalización de las funciones simbióticas puede ser diferente entre especies y entre cepas de la misma especie. Tercero que pueden existir genes simbióticos que no pueden ser expresados en Agrobacterium ya sea porque no los "entiende" Agrobacterium o porque el desarrollo del nódulo no llega a una condición tal que los genes puedan ser expresados debido a que no existen los genes involucrados en los pasos morfogenéticos precedentes o a que señales de la planta que induzcan la transcripción de genes simbióticos no puedan permearse dentro de Agrobacterium.

Exopolisacaridos y lipopolisacáridos

Se ha puesto gran interes en estudiar los polisacaridos y los lipopolisacáridos de la superficie de Rhizobium con la idea de que estas moléculas tienen un papel primordial en el reconocimiento específico Rhizobium-leguminosa en la que se

supone actua como mediadora un lectina especifica presente el las raices de las leguminosas. Para explorar esta hipótesis, se han aislado en varias especies de Rhizobium, mutantes con una morfología de colonia atípica que han perdido su mucosidad característica (fenotipo Muc⁻) y su capacidad de ligar calcofluor (4). Estas mutantes tienen alterada la producción de los exopolisacáridos ácidos (EPS) e inducen nódulos inefectivos que no cuentan con células infectadas, ni con la formación de cayados de pastor, ni de hilos de infección pero tienen un meristemo y haces vasculares bien desarrollados (fenotipo Had⁺, Hac⁻, Inf⁻, Ndv⁺, Bar⁻, Bad⁻, Fix⁻). Algunas bacterias se pueden encontrar en las capas mas superficiales del nódulo. Esto significa que las mutantes exo pueden desacoplar el desarrollo del nódulo en dos procesos mas o menos independientes que se llevan al cabo al mismo tiempo, uno de ellos esta involucrado en la inducción y desarrollo del tejido vegetal que conformará el nódulo y el otro esta implicado en los procesos de invasión e infección bacteriana al tejido nodular. Es posible corregir el defecto simbiótico de las mutantes exo con la adición de los EPS específicos. (Djordjevic, et al. 1987). En R. meliloti estas mutaciones se localizan en los genes exoA, exoB, exoC, exoF (Finan, et al. 1985) (Finan, et al. 1986) (Leigh, et al. 1985). En esta misma especie se han aislado mutantes en el gene exoH que sintetizan EPS pero que su capacidad de ligar calcofluor esta alterada. Las mutantes con alteraciones en exoH, inducen la formación de cayados de pastor en los pelos radicales y de nódulos que carecen de células infectadas. En algunos de ellos es posible observar hilos de infección que abortan en las primeras capas del cortex (fenotipo:Had⁺, Hac⁺, Inf^{+/-}, Ndv⁺, Bar⁻, Bad⁻, Fix⁻). Los EPS de las mutantes en exoH no contienen los residuos succinil que caracterizan los EPS de la cepa silvestre (Leigh, et al. 1987). En Rhizobium meliloti se han aislado otros genes, exoD y exoK, cuyas mutantes tienen alterado la producción de los exopolisacáridos pero que no tienen efecto en el desarrollo del nódulo. Al menos en Rhizobium meliloti, los genes que participan en la producción de exopolisacáridos se encuentran agrupados en dos conjuntos de genes, uno de ellos, en cromosoma, formado por los genes exoC y exoD y el otro formado por los genes exoA, exoB, exoF, exoH y exoK que se localiza en un plásmido diferente al que porta los genes nif y nod.

El exopolisacárido ácido mayoritario de Agrobacterium y Rhizobium consiste en un octasacárido de glucosa y galactosa en una proporción de 7:1, modificado con grupos piruvil, succinil, y acetyl. La posición de estas modificaciones dentro del octasacárido se desconocen, por tanto no se sabe si existe variación en el número y posición de estos residuos entre cepas y entre especies (McNeil, et al. 1986). Se han aislado mutaciones que afectan la producción de los exopolisacáridos en A. tumefaciens que pueden complementarse con los genes equivalentes de R. meliloti y viceversa, los genes clonados de A. tumefaciens pueden complementar las mutaciones equivalentes en R. meliloti e incluso corregir, en algunos casos (excepto exoC), los defectos en simbiosis (5). Las mutaciones en el gene exoC, evitan que se produzcan los

EPS y los (1-2)-beta-glucanos e inhiben la virulencia de esta bacteria, sin embargo, las mutaciones en los genes exoA, exoB, exoD, exoF y exoG (este último solo presente en A. tumefaciens) no tienen efecto alguno sobre la virulencia. Un gene homologo a exoH de R. meliloti no se ha buscado en A. tumefaciens, ni se ha encontrado alguno con una función equivalente.

Es importante hacer notar que el fenotipo simbiótico de las transconjugantes de A. tumefaciens que portan plásmidos simbióticos de R. meliloti son muy parecidos a los que muestran las mutantes en exoH de R. meliloti. Lo anterior puede indicar que las modificaciones al esqueleto de azucar de los EPS juegan un papel importante en el desarrollo de un nódulo efectivo. Otro dato que apoya este punto de vista es que mutaciones en los nodABCD de R. trifolii alteran el número y tipo de las sustituciones de grupos no-carbohidrato en los EPS. Si lo expuesto aquí es cierto, se puede predecir que si a las transconjugantes de A. tumefaciens con plásmidos simbióticos de R. meliloti se les introduce los genes exoC y exoH de R. meliloti, estas transconjugantes podrán desarrollar una simbiosis efectiva en alfalfa.

También se han localizado en A. tumefaciens y en Rhizobium un par de genes cromosomales cuya función es esencial para que estos géneros interaccionen con plantas. En A. tumefaciens estos loci, llamados chvA y chvB, son necesarios para que A. tumefaciens se fije al las células vegetales y las transforme. El locus chvB se ha implicado en la producción de (1-2)-beta-glucano, un exopolisacárido típico de las Rhizobiaceae. Las inserciones en los genes equivalentes (ndvA y ndvB) en R. meliloti, hacen que la cepa portadora sea incapaz de nodular correctamente. Por ejemplo las mutantes ndvB inducen nódulos con un fenotipo Had⁺, Hac⁺, Inf⁻, Ndv⁺, Bar⁻, Bad⁻, Fix⁻. El efecto de las mutaciones en los genes ndvA y ndvB se puede corregir introduciendo los genes chvA y chvB de A. tumefaciens y viceversa. Lo último nos puede indicar que los (1-2)-beta-glucanos participan junto con los exopolisacáridos ácidos en el mismo estadio del desarrollo del nódulo (Dylan, et al. 1986). Es muy probable que A. tumefaciens con mutaciones en chvA o en chvB que porten plásmidos simbióticos induzcan nódulos defectuosos.

En otras especies de Rhizobium se han aislado otros genes que participan en la producción o regulación de los EPS. Por ejemplo, en R. phaseoli se han descrito un par de genes localizados en el plásmido simbiótico que parecen tener un papel regulatorio en la producción de los EPS durante la simbiosis. Uno de ellos, el gene psi, cuando se introduce en multicopia reprime la síntesis de los EPS explanata y parece afectar el desarrollo del nódulo. las mutaciones por inserción en este gene inhiben la fijación de nitrógeno. El otro gene psr corrige estos defectos cuando también se introduce en multicopia (Borthakur, et al. 1985) (Borthakur y Johnston, 1987).

En R. phaseoli se ha aislado una mutación, fuera del plásmido simbiótico, en un gene llamado pss que inhibe la

producción de los EPS explanata pero no tiene efecto en la simbiosis. Si se sustituye el plásmido simbiótico de esta cepa por uno proveniente de Rhizobium leguminosarum esta transconjugante es incapaz de nodular pero el efecto puede ser corregido introduciendo una clona de Xanthomonas campestris que porta genes exo (Borthakur, et al. 1986).

Otra estructura de la superficie de los rhizobia que se le ha adjudicado un papel en el desarrollo del nódulo son los lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos se componen en general por una fracción lipídica (lípidos A), un polisacárido (PS1 o antígeno O) y un polisacárido (PS2) y muestran una variación en composición bastante considerable entre especies y entre cepas. Las primeras evidencias indirectas del posible papel de los lipopolisacáridos en la simbiosis surge del hecho de que cepas de R. trifolii, o de B. japonicum curadas de sus plásmidos simbióticos o con deleciones en estos plásmidos muestran alteraciones en la estructura de sus polisacáridos (Carlson, et al. 1985) (Carlson, et al. 1987). En R. phaseoli se ha aislado una mutante cuyos lipopolisacáridos no cuentan con la porción PS1 e inducen nódulos que carecen de bacterias puesto que los hilos de infección abortan (Noel, et al. 1986). Lo que apunta a que los lipopolisacáridos tienen un papel relevante en la morfogénesis del nódulo.

Por lo expuesto anteriormente, no hay evidencia clara que indique que los exopolisacáridos o los lipopolisacáridos tengan una participación directa en el reconocimiento específica Rhizobium-leguminosa. Sin embargo, es indudable que ambos tipos de macromoléculas tienen una participación central en los primeros estadios de desarrollo del nódulo.

Papel de los genes fix y nif en la morfogénesis del nódulo.

Para finalizar, en Rhizobium y Bradyrhizobium, se han identificado un conjunto de genes que son esenciales para la fijación biológica del nitrógeno y, que en la mayor parte de las especies, se encuentran cerca de los genes de nodulación. Los genes de la fijación de nitrógeno se pueden dividir en dos grupos. Uno de ellos lo conforman todos aquellos genes que tienen homología con alguno de los 17 genes nif de Klebsiella pneumoniae como es el caso de los genes nifK, nifD y nifH que codifican para las subunidades de la nitrogenasa y de la nitrogenasa reductasa; el gene de nifA (o fixD) que es un regulador transcripcional positivo de muchos de los genes nif y fix; nifB (o fixZ) y nifE que son genes cuyos productos son necesarios para la síntesis del cofactor FeMoco; y nifF y nifJ que codifican para proteínas transportadoras de electrones para el sistema de nitrogenasa. El otro grupo están los genes de fijación de nitrógeno que no tienen homología con los nif de K. pneumoniae e incluye al gene fixF y al operón con los genes fixA, fixB, fixC y fixX (Aguilar, et al. 1985) (Earl, et al. 1987). Los transcritos de este operón junto con el de nifHDK son los más abundantes encontrados en los bacteroides. El gene fixF tiene homología con la ferredoxina I de

Azotobacter vinelandii pero al resto de los genes que componen este grupo no se les ha asignado una determinada función bioquímica (Earl, et al. 1987). Todas las mutaciones que afectan los genes antes descritos inducen, en general, nódulos en mayor cantidad y de menor tamaño que los de las cepas silvestres pero todos ellos inefectivos. Un análisis ultraestructural de los nódulos inducidos por las cepas mutantes indica que estos se desarrollan normalmente e incluso los bacteroides llegan a diferenciarse correctamente, sin embargo, senescen prematuramente (fenotipo Fix^- , Nop^-) (Hirsch, et al. 1983) (Hahn, et al. 1984) (Aguilar, et al. 1985) (Hans-Martin, et al. 1986) (Hirsch y Smith 1987). La gran similitud estructural de todos los nódulos inducidos por cepas Fix^- sugiere que el mismo amonio puede jugar un papel importante en la última parte del desarrollo del nódulo.

NOTAS

1. Existen otros tipos de órganos inducidos por organismos diferentes a Rhizobium y a Bradyrhizobium que también se les conoce como nódulos pero que su estructura es completamente diferente a la de los nódulos fijadores de nitrógeno. En la presente revisión solo me referire a estos últimos.

2. La clasificación de las bacterias que forman nódulos en leguminosas se basa principalmente en la velocidad de crecimiento de las bacterias en un medio rico y en su especificidad de infección. De este modo se han propuesto tres géneros Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium

El primer género encierra cuatro especies: R. leguminosarum conformado a su vez por tres biovares, que incluyen a todas las bacterias de crecimiento rápido que nodulan trébol (bv. trifolii), frijol (bv. phaseoli), habas, chicharos y lentejas (bv. viceae). R. meliloti con aquellas que nodulan alfalfa. R. fredii que incluye aquellas cepas de crecimiento rápido que nodulan soya y R. loti que contiene a todas aquellas bacterias de crecimiento rápido que nodulan altramuza, Cicer, Sesbania, Leucaena, Mimosa y Lablab.

El segundo género tiene una sola especie B. japonicum que abarca todas aquellas cepas de crecimiento lento que nodulan soya, Vigna, y algunas especies de Lotus (Elkan, 1984.)

El tercer género, Azorhizobium, abarca aquellas cepas que nodulan el tallo de Sesbania rostrata.

3. Ndv^{a} significa retraso en la aparición de nódulos.

4. El calcofluor es una sustancia que se liga a los polisacáridos con uniones beta formando un complejo fluorescente en luz ultravioleta.

5. Datos similares se han obtenido con genes clonados de Azospirillum brasilense. Dichas clonas pueden corregir los defectos en la producción de EPS de mutantes de R. meliloti en exoC y en exoB e incluso corregir el defecto simbiótico de las mutantes en este último gen (Michiels, et al. 1988).

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, O.M., Kapp, D., Pühler, A. 1985. Characterization of Rhizobium meliloti fixation gene (fixF) located near the common nodulation region. *J Bacteriol* **164**: 245-254.

Bauer, W.D. 1981. Infection of legumes by rhizobia. *Annu Rev Plant Physiol.* **32**: 407-449.

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**: 271-278.

Borthakur, D., Downie, J.A., Johnston A.W.B., Lamb, J.W. 1985. psi, a plasmid-linked R. phaseoli gene that inhibits exopolisaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol Gen Genet* **200**: 278-282.

Borthakur, D., Barber, C.E., Lamb, J.W., Daniels, M.J., Downie, J.A., Johnston, A.W.B. 1986. A mutation that blocks exopolisaccharide synthesis prevents nodulation of peas by R. leguminosarum but not of beans by R. phaseoli and is corrected by cloned DNA from Rhizobium or the phytopathogen Xanthomonas. *Mol Gen Genet* **203**: 320-323.

Borthakur, D. y Johnston A.W.B. 1987. Sequence of psi, a gene on the symbiotic plasmid of R. phaseoli which inhibits exopolisaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by psr another gene on the symbiotic plasmid. *Mol Gen Genet.* **207**: 149-154.

Bhuvanewari, T.V., Turgeon, B.G. y Bauer, W.D. 1980. Early events in the infection of soybean (Glycine max L. Merr) by Rhizobium japonicum. I Location of infectible root cells. *Plant Physiol.* **66**: 1027-1031.

Carlson, W.R., Kalembasa, S., Turowsky, D., Pachori, P., Noel, D.K. 1987. Characterization of the lipopolysaccharide from R. phaseoli mutant that is defective in infection thread development. *J Bacteriol.* **169**: 4923-4928.

Carlson, R.W., Shatters, R., Duh, J., Turnbull, E., Hanley B., Rolfe, B.G. y Djordjevic. 1987. The isolation and characterization of the extracellular polysaccharides and lipopolysaccharides from several R. trifolii mutants affected in root hair infection. *Plant Physiol.* 84: 421-427.

Carlson, R.W., y Yadav M. 1985. Isolation and partial characterization of the extracellular polysaccharides and lipopolysaccharides from fast growing Rhizobium japonicum USDA 205 and its Nod⁻ mutant, HC205, which lacks the symbiotic plasmid. *Appl Environ Microbiol.* 50: 1219-1224.

Chua, K-Y, Pankhurst, C.E., Macdonald, P.E., Hopcroft, D.G., Jarvis, B.D.W., Scott, D.B. 1985. Isolation and characterization of transposon Tn₅-induced symbiotic mutants of Rhizobium loti. *J Bacteriol.* 162: 335-343.

Debelle, F., Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martinez, E., Dénarié, J. y Truchet, G. 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of Rhizobium meliloti. *J. Bacteriol* 168:1075-1086.

Debelle, F. and Sharma, S.R. 1986. Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti RCR 2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucleic Acid Res.* 14: 7453-7472.

Djordjevic, M.A., Redmond J.W., Batley, M. y Rolfe, B.G., 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii. *EMBO.* 6: 1173-1179.

Djordjevic, M.A., Schfield, 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: 463-471.

Djordjevic, M.A., Gabriel D.W., Rolfe, B. 1987. Rhizobium - the refined parasite of legumes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 145-168

Djordjevic, S.P., Chen, H., Batley, B., Redmond, J.W., Rolfe B.G. 1987. Nitrogen fixation ability of exopolisaccharide synthesis mutants of Rhizobium sp. strain NGR234 and R. trifolii is restored by the addition of homologous exopolisaccharides. *J Bacteriol.* 169: 53-60.

Downie, J.A., Knight, C.D., Johnston, A.W.B. y Rossen, L. 1985. Identification of genes and gene products involved in nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum. *Mol Gen Genet.* 198: 255-262.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L. Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinsky, D.R. y Ditta, G. 1986. R meliloti genes required for nodulation are related to chromosomal virulence genes in Agrobacterium tumefaciens. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4403-4407.

Earl, C.D., Ronson C.W., Ausubel, F.M. 1987. Genetic and structural analysis of the Rhizobium meliloti fixA, fixB, fixC and fixX genes. J Bacteriol: 169: 1127-1136.

Elkan, G. H. Taxonomy and metabolism of Rhizobium and its genetic relationships. En: Biological Nitrogen Fixation, Ecology, Technology, and Physiology. Ed. Alexander M. Plenum press, ew York and London , 1984.

Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A., Deegan, S., Walker, G.C., Signer, E.R. 1985. Symbiotic mutants of Rhizobium meliloti that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40. 869-877.

Finan T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F. y Signer E.R. 1986. A second symbiotic megaplasmid in Rhizobium meliloti encodes exopolysaccharide and thiamine genes. J Bacteriol 167: 66-72.

Firmin, J.L., Wilson, K.E., Rossen, L. y Johnston A.W.B. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in Rhizobium reversed by other compounds present in plants. Nature: 324:90-92.

Fischer, H-M., Alvarez-Morales A., Hennecke, H. 1986. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: Bradyrhizobium japonicum nifA gene is involved in control of nif gene expression and formatin of determinate symbiosis. ENBO J. 5: 1165-1173.

Göttfert, M., Horvath, B., Kondorosi, E., Putnoky, P., Rodriguez-Quinones, F., Kondorosi, A. 1986. At least two nodD genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti. J Mol Biol. 191: 411-420.

Hahn, M., Meyer, L., Studer, D., Regensburger, B. y Hennecke, H. 1984. Insertion and deletion mutations within the nif region of Rhizobium japonicum. Plant Mol Biol 3: 159-168.

Hirsch, A.M., Bang, M., Ausubel F.M. 1983. Ultrastructural Analysis of ineffective alfalfa nodules formed by nif::Tn5 mutants of Rhizobium meliloti. J Bacteriol 155: 367-380.

Hirsch, A.M. y Smith, C. 1987. Effects of Rhizobium meliloti nif and fix mutants on alfalfa root nodule development. J Bacteriol 169: 1137-1146.

Hombrecher, G., Gotz, R., Dibb, N.J., Downie, J.A., Johnston, A.W.B., Brewin, J. 1984. Cloning and mutagenesis of nodulation genes from R. leguminosarum TOM, a strain with extended host range. *Mol Gen Genet* 194: 293-298.

Hooykaas, P.J.J., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuink, A.J.G., van Brussel, A.A.N., Schilperoot, R.A. 1985. Expression of a Rhizobium phaseoli Sym plasmid in R. trifolii and Agrobacterium tumefaciens: incompatibility with a R. trifolii Sym plasmid. *Plasmid* 14: 47-52.

Horvath, B., Kondorosi E., John, M., Schmidt J., Török, I., Gyorgypal, Z., Barabas, I., Weineke, U., Schell, J. and Kondorosi, A. 1986. Organization, structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* 46: 335-346.

Jacobs, T.W., Egelhoff, T.T. y Long, S. 1985. Physical and genetic map of 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., Schell, J. 1985. Expression of the nodulation gene nodC of Rhizobium meliloti in Escherichia coli: role of the nodC gene product in nodulation. *EMBO*. 4:2425-2430.

John, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Krüssmann H-D and Schell J. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of Rhizobium meliloti common nodulation protein NodC. *EMBO* 7: 583-588.

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: 445-452.

Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst C.E., Broughton, W.J., Banfalvi, Z. 1982. Mobilization of Rhizobium meliloti megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and Agrobacterium. *Mol Gen Genet* 188: 433-439

Leigh, J.A., Signer, E.R. y Walker G.C. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules. *PNAS* 82: 6231-6235.

Leigh, J.A., Reed, J.W., Hanks, J.F., Hirsch, A.M. y Walker, C.G. 1987. Rhizobium meliloti mutants that fail to succinylate their calcofluor binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* 51: 579-587.

Lewin, A., Rosenberg, C., Meyer, H., A.C.H. Wong, Nelson, L., J.F. Manen, Stanley J. D.N. Dowling, Dénarie, J., Broughton, W.J. 1987. *Plant Mol Biol* 8: 447-459.

Long, S. 1984. Genetic of Rhizobium nodulation. pp 256-306. In Kosuge, T. y Nester E.(ed). Plant microbe interactions. Mc Millan Publishing Co. Inc. N.Y.

Long, S. 1985. Physical and genetic map of a Rhizobium meliloti nodulation gene region and nucleotide sequence of nodC. J. bacteriol 162: 469-472

Lugtenberg B., van Brussel, A., Cremers, H.C., de Maagd, R., Mulders, I., Okker, R., Pees, E., Rocourt, K., Schlaman, H., Spaik, H., Tak, T., Wijffelman, C., Wijffjes A., Zaat, S. 1988. Signals involved in the regulation of nodulation by Rhizobium. 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant Microbe Interaction. Book of Abstracts.

Martínez, E., Palacios, R., Sánchez, F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J. Bacteriol 169:2828-2834.

McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P., van Veen, R., Hooykaas, P., Schilperoot, R. y Dell, A. 1986. The discernible structural features of the acidic exopolisaccharides secreted by different Rhizobium species are the same. Carbohydr. Res. 146: 307-326.

Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Gool, A. y Signer, E.R. 1988. Complementation of R. meliloti exo⁻ mutants with cloned Azospirillum DNA. 7th International Congress on Nitrogen Fixation. Book of Abstracts.

Mulligan, J.T. y Long, S. 1985. Induction of Rhizobium meliloti nodC expression by plant exudate requires nodD. 1985. Proc Natl Acad Sci USA. 82: 6609-6613.

Nayudu, M. y Rolfe B.G. 1987. Analysis of R-primes demonstrates that genes for broad host range nodulation of Rhizobium strain NGR234. Mol Gen Genet 206: 326-337

Nieuwkoop A.J., Banfalvi, Z., Deshmane, N., Gerhold, D. Schell M., Sirotkin, K.M. and G., Stacey. 1987. A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol. 169: 2631-2638.

Noel, K.D., VandenBosch, K.A., Kulpaca, B. 1986. Mutations in R. phaseoli that lead to arrested development of infection threads. J. Bacteriol 168: 1392-1401.

Rodríguez-Quiñones F., Banfalvi, Z., Murphy, P., Kondorosi A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in Rhizobium. Plant. Mol. Biol. 8: 61-75.

Rolfe, B.G. y Gresshoff, P.M. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 39: 297-319.

Rosenberg, C., Boistard, P., Denarie, J., Casse-Delbert, F.L. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 184:326-333.

Rossen, L. Shearman, C.A. Johnston, A.W.B., Downie, J.A. 1985. The nodD of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the expression of nodABC genes. EMBO J. 4: 3369-3373.

Rossen L., Davis E.O., Johnston A.W.B. 1987. Plant induced expression of Rhizobium genes involved in host specificity and early stages of nodulation. TIBS 430- 433.

Rostas, K., Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A., Kondorosi, A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in Rhizobium Proc Natl Acad Sci USA 83: 1757-1761.

Schmidt, J., John, M., Wieneke, U.M Krussmann, H.D. y Schell, J. 1986. Expression of the nodulation gene nodA in Rhizobium meliloti and localization of the gene product in the cytosol. Proc Natl Acad Sci. USA 83: 9581-9585.

Schofield, P.R., Ridge, R.W., Rolfe, B.G., Shine, J. y Watson J.M. 1984. Host specific nodulation is encoded on a 14Kb DNA fragment in Rhizobium trifolii. Plant Mol Biol. 3: 3-11.

Schofield, P.R. y Watson, J.M. 1986. DNA sequence of the Rhizobium trifolii nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding the nodABC and nodEF genes. Nucleic Acid Res. 14: 28891-28905.

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

Spanick H.P., Wijffelman, C.A., Pees 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.

Truchet, G., Rosenberg, C., Vasse, J., Julliot J.S., Camut, S., Denarie, J. 1984. Transfer of Rhizobium meliloti pSym into Agrobacterium tumefaciens: host-specific nodulation by atypical infection. J. Bacteriol 157: 134-142.

Turgeon, B.G. and Bauer, W.D. 1985. Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by Rhizobium japonicum. Planta 163: 328-349.

Wijffelman, C.A., Pees, E., van Brussel, A.A.N., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. 1985. Genetic and functional analysis of the nodulation region of Rhizobium leguminosarum sym plasmid pRL1JI. Arch Microbiol 143:225-232.

CHARACTERIZATION OF Rhizobium phaseoli -Sym PLASMID SEQUENCES INVOLVED IN NODULE MORPHOGENESIS AND HOST-RANGE SPECIFICITY.

Miguel Angel Cevallos¹, Martha Vázquez¹, Araceli Dávalos¹,
Guadalupe Espín¹, Jorge Sepúlveda², Carmen Quinto¹.

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas.
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.
U.N.A.M.
Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México.

²Unidad de Microscopía.
Instituto de Fisiología Celular.
U.N.A.M.
Ciudad Universitaria, México.

ABSTRACT

Key words: host-range, nodulation genes, Phaseolus vulgaris, Rhizobium phaseoli, symbiosis, Sym plasmid.

Two nodulation regions from the symbiotic plasmid (pSym), of Rhizobium phaseoli strain CE-3, were identified. The two regions were contained, both, in overlapping cosmid clones pSM927 and pSM991. These cosmid clones, in a R. phaseoli pSym-cured strain background, were found to induce ineffective nodules on Phaseolus vulgaris roots

Transconjugants of R. meliloti harboring cosmid pSM991 were able to induce nodule-like structures on bean roots indicating that this cosmid contains host-range determinants.

The analysis of deletions and insertion mutants of the sequences of cosmid pSM991 indicated that the genes responsible of the induction and development of nodules in P. vulgaris are organized in two different regions separated by approximately 20 kb. One region is within a 6.8 kb EcoRI fragment and include the common nodABC genes. The other region is located in a 3.5 kb EcoRI fragment and contains some of the genes required for host-range determination. The organization of these and other related sequences in R. phaseoli is discussed.

INTRODUCTION

Rhizobium phaseoli induces nitrogen fixing nodules on common bean roots (Phaseolus vulgaris L.). In R. phaseoli, like in other fast growing Rhizobium species, genes determining both, nitrogen fixation and at least the early steps of nodulation are located on large plasmids [2,16,33]. R. phaseoli strain CE-3 has six plasmids; one of them (p42d) of approximately 280 kb. confers the ability to nodulate and fix nitrogen on bean roots [27].

Nitrogenase structural genes are found in three different regions on this plasmid. nif regions a and b carry each one copy of the genes nifHD and K, nif region c carries a single nifH gene [31]. When plasmid p42d is transferred into a plasmid-less Agrobacterium tumefaciens strain, the transconjugants elicit ineffective nodules on bean roots [27][6]. In R. phaseoli, with the loss of plasmid p42d the abilities to nodulate and to fix nitrogen are concomitantly lost. The reintroduction of the plasmid restores the complete nodulation and nitrogen-fixing properties.

In this paper we report the isolation and characterization of two regions from the pSym of R. phaseoli required for nodule induction, nodule development, bacterial release, and host-range determination.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. The strains and plasmids used in this work are listed in Table 1.

Media and bacterial growth conditions. R. phaseoli and R. meliloti were grown in PY medium at 30°C [25]. Escherichia coli was grown in LB medium at 37°C [21] or in LBCM which is LB medium supplemented with CaCl₂ and MgSO₄. The following concentration of antibiotics were used for selection (µg/ml): Rifampicin (Rf) 50, Tetracycline (Tc) 5, Kanamycin (Km) 30, Streptomycin (Sm) 100, Chloramphenicol (Cm) 30.

Bacterial crosses. Recipients and donors were grown in liquid medium to stationary phase and then were mixed on PY plates and incubated at 30°C overnight. Cells were resuspended in sterile water and serial dilutions were plated on the appropriate selective media.

Cloning procedures. Plasmid isolation, total DNA purification, restriction endonuclease digestion of DNA, DNA cloning and transformation, Southern blot analysis, nick translations and hybridizations were carried out as described by Maniatis et al [21].

Nodulation test and acetylene reduction activities. Surface sterilized seeds of Phaseolus vulgaris L. cv. negro Jamapa, were grown in 250 ml Erlenmeyer flasks with 200 ml of nitrogen free nutrient agar 0.8% [41]. Three or four days after germination in the dark, plantlets were inoculated with 1 ml of saturated liquid culture of the appropriate Rhizobium strain. After twenty days of incubation in a growth chamber at 26°C, nodulation was scored and nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction assay of nodulated roots [22]. A similar procedure was used with Medicago sativa cv. peruana. except that seedlings were grown on slants in 25x200mm tubes.

Re-isolation of bacteria from nodules. Nodules were detached, surface-sterilized with a 20% v/v commercial bleach solution for

ten minutes rinsed in sterile water, and were crushed and streaked in PY plates and incubated for three days at 30°C. Ten isolated colonies from each nodule were checked in the appropriate selective media for antibiotic resistance markers.

Microscopic examination of nodules. Twenty days-old nodules were fixed for 90 min with 4 % glutaraldehyde and post-fixed in 1 % osmium tetroxide for 1 h as described by Truchet [39]. Samples were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in epon 812. Semithin sections of 1.5 µm were stained with toluidine blue and observed in a light microscope. Thin sections of 0.9 µm were stained with uranyl acetate 2% and lead citrate 5% and observed under a transmission electron microscope.

Isolation of specific gene detectors for common nod genes. The following restriction fragments of plasmid pKSK5 [18] were electroeluted from 1% agarose gels and then nick translated: A BglII fragment of 2.2 kb used as nodD probe; a SstII fragment of 1.95 kb as nodBC probe a HindIII fragment of 0.65 kb as nodC probe and a SstII-PvuII fragment of 0.65 kb as a nodAB probe [35,38].

Mobilization of cosmids to Rhizobium. Since cosmid pSUP205 is a mobilizable vector but unable to replicate in Rhizobium, it was necessary to cointegrate it with another plasmid with capacity of replication in Rhizobium. To do this, E. coli strain HB101 (pNC206) carrying a broad-host range incP1, Km^r plasmid was transform with cosmid-clones (Tc^r) selecting Km^r-Tc^r colonies. Transformants containing both plasmids were conjugated with strain CFN2001 selecting Rf^r-Km^r-Tc^r colonies.

Cosmid mutagenesis with MudIIPR13. Cosmid pSM991-25 was mutagenized with bacteriophage MudIIPR13 which is a MudIIPR3 derivative where the nptI sequence was substituted by a promoter-less lac operon (P. Ratet, personal communication)[32]. The cosmid was introduced in MC4100 (Mucts)(MudIIPR13) by triparental mating using pRK2013 as helper plasmid and selecting for Cm^r-Tc^r-Km^r colonies. The resulting strain was thermoinduce to obtain a lysate which was used to infect strain M8820(Mu) where Cm^r-Tc^r colonies were selected. Thirty five Cm^r-Tc^r colonies were used to localize the insertion by restriction mapping with EcoRI and BamHI. The mutated cosmids were introduced as cointegrates with pNC206 in strain CFN2001rif as described above. To corroborate the stability of the insertions, Southern blots of total DNAs of Rhizobium transconjugants were done using as probe pSM991-25.

Preparation and use of Mu lysates. An overnight culture of strain MC4100(Mucts)(MudIIPR13)(pSM991-25) grown at 30°C in LB Cm-Tc was diluted 1:100 in 10 ml of LBCM. This culture was grown at 30°C with shaking for approximately three hours to mid exponential phase. The culture was then shifted to 37°C, 20 min with shaking and incubated later at 42°C in the same agitation conditions until lysis was observed. Chloroform, MgSO₄ and CaCl₂ were added to the lysate at final concentration of 1%, 2 mM and 20 mM respec-

tively. The debris was removed by centrifugation. Simultaneously the receptor strain M8820 was grown to mid exponential phase and concentrated 10 folds in LBCM. Infections were carried out by mixing 0.1 ml of the M8820(Mu) concentrated culture with 0.1 ml of the lysate. Absorption was carried out at 30°C for 30 min without shaking. Then 2 ml of LB was added and the mixture was incubated with agitation for 45 min at 30°C. The cells were washed with 10 mM NaCl before plating in LB Cm CaCl₂ 5 mM.

RESULTS

Isolation of recombinant cosmids carrying *nif* and *nod* genes

A cosmid library was constructed in pSUP205 using total DNA from *R. phaseoli* strain CE-3 as follows: Total *R. phaseoli* DNA was partially digested with *Eco*RI and size fractionated in a NaCl gradient. Fractions in the 30-50 kb range were pooled, cloned into the *Eco*RI site of pSUP205 and packaged *in vitro* into lambda phage heads. The mixture was used to infect *E. coli* strain K802. About 1000 Tc^r - Cm^r colonies were recovered.

The cosmid library was screened by colony hybridization with a homologous *nif*HDK probe (plasmid pCQ12) [30]. The *Eco*RI restriction pattern of the positive clones were analyzed and eleven clones representing the 3 *nif* regions were identified. The *nif* cosmids were hybridized with the plasmid pSK5 which carries the "common" *nod* genes from *R. meliloti* [18]. Cosmids pSM991, pSM927, pSM367 and pSM828 exhibited homology with this probe. The first two cosmids contained *nif* region a, the next contained *nif* region c and the last one *nif* region b. These results confirm a close linkage between the *nif* and *nod* genes in the Sym plasmid of *R. phaseoli* as described earlier [19,20].

In order to determine the organization of the sequences homologous to the common *nod* genes of *R. meliloti*, the cosmids containing *nif-nod* genes were hybridized against specific probes for *nod*AB, *nod*BC, *nod*C and *nod*D genes (see Materials and Methods). The strain CE-3 contains five *Eco*RI fragments which hybridized with the *nod* probes. An *Eco*RI fragment of 6.8 kb contained the *nod*ABC genes and were present in cosmids pSM991, pSM927 and pSM367. A 3.3 kb *Eco*RI fragment present only in cosmid pSM367 showed a weak homology with the *nod*C probe. Three *Eco*RI fragments of 5.2, 4.9, 3.4 kb hybridized with the *nod*D probe. The 5.2 kb fragment were present in cosmids pSM991 and pSM367. The fragment of 4.9 kb was found only in cosmid pSM828 (Figure 1). The 3.4 fragment was not contained in cosmids described above but was present in the symbiotic plasmid as indicated the hybridizations against total DNA of the wild type strain and the pSym-cured derivative (data not shown).

Interfunctionality between the common *nod* genes of *R. phaseoli* and *R. meliloti*.

To determine the functionality of the *nod*ABC sequences present in pSM991, the cosmid was introduced in three strains of

R. meliloti carrying Tn5 insertion mutations in *nodA* (GMI 5382), *nodB* (GMI5387) and *nodC* (GMI5383). The transconjugants were inoculated on alfalfa seedlings. All transconjugants were able to induce normal nodules between 15 and 35 days after inoculation. The *R. meliloti* wild type strain always induced nitrogen-fixing nodules in less than two weeks. The plants inoculated with the mutant strains did not develop nodules (see Table 2).

TABLE 2.

Strain	Nodulation on <i>M. sativa</i>	Fixation on <i>M. sativa</i>
RCR2011	+	+
GMI5382	-	-
GMI5382 (pNC206::pSM991)	+ ^d	+
GMI5387	-	-
GMI5387 (pNC206::pSM991)	+ ^d	+
GMI5383	-	-
GMI5383 (pNC206::pSM991)	+ ^d	+

^d delayed nodulation

Identification of nodulation genes by direct complementation on a pSym-cured strain

Sequences involved in the induction and development of nodules in common bean were isolated by introducing *nif-nod* cosmids into a pSym-cured *R. phaseoli* strain (CFN2001).

Transconjugants containing cointegrates between cosmids and pNC206 were inoculated on bean seedlings. Plants were analyzed for the presence of root nodules after twenty days. Only cosmids pSM991 and pSM927 both containing the complete *nifHDK* operon of *nif* region were able to induce nodules although these nodules had a Fix⁻ phenotype (Figure 2).

Definition of the sequences involved in nodulation

Cosmids pSM991 and pSM927 only differ in two *EcoRI* fragments, both *EcoRI* fragments are at the end of each insert (Figure 2). Presumable sequences required for nodulation are contained in the *EcoRI* fragments shared by these cosmids. To identify those *EcoRI* bands involved in nodulation, a partial *EcoRI* digest of cosmid pSM991 was ligated in a final DNA concentration of 20 ng/μl in the reaction mixture with the purpose of promoting monomolecular ligations. An aliquot of 100 ng was used to transform the *E. coli* strain HB101. The analysis of the restriction patterns of fifty transformants showed the loss of some *EcoRI* bands. These deleted cosmids were introduced into the pSym-cured strain and they were inoculated onto bean seedlings. Twenty derivatives induced nodules after twenty days.

A comparison between the *EcoRI* restriction patterns of cosmids pSM927, pSM991 and its deleted derivatives which conserve the property of induce nodules showed that all nodule elicity

cosmids share three EcoRI bands, one of 6.8 kb containing the nodABC and other two of 3.5 kb and 0.5 kb. Deletions lacking any of these bands were unable to induce nodules (Figure 3).

To determine the sequences involved in nodulation, the cosmid pSM991-25 a deleted derivative which carries the genes necessary for nodule induction and development was mutagenized with MudII PR13. Thirty five independent insertions were isolated and their localizations were determined by restriction enzyme mapping and Southern blotting as described in Material and methods. The symbiotic phenotype of the mutated cosmids were analyzed introducing them into the pSym-cured strain and tested for nodulation on bean plants. Ten mutants showed a Nod⁻ phenotype. Seven of these mutants were localized in the 6.8 kb EcoRI fragment which contains the nodABC genes. The three remaining mutations were localized in the 3.5 kb fragment (Figure 4). Thus, two different regions, separated by approximately 20 kb, were responsible of the symbiotic phenotype of cosmid pSM991.

Localization of host-range genes

To localize the sequences involved in the host-range determination cosmids pSM828, pSM367 and pSM991 were introduced into Rhizobium meliloti, a specie that normally nodulates alfalfa but not beans. Only the transconjugant with cosmid pSM991 was able to induce few and small nodule-like structures on bean seedlings, suggesting that host-range genes are located in this cosmid (Figure 5).

Two deletion derivatives of cosmid pSM991 were also introduced into R. meliloti; pSM991-25 containing the two nodulation regions within EcoRI fragments of 6.8 kb genes and 3.5 kb, and pSM991-32 which only carry the nodulation region in the 6.8 kb EcoRI fragment. The transconjugants were inoculated on bean seedlings and nodulation were scored after twenty days. Plants inoculated with the transconjugants carrying pSM991-25 developed a few nodule-like structures similar to those induced by the complete cosmid (Table 3).

TABLE 3.

Strain	Nodulation on <u>P. vulgaris</u>	Fixation on <u>P. vulgaris</u>
RCR2011 Rif	-	-
RCR2011 Rif (pNC206::pSM991)	+ ^a	-
RCR2011 Rif (pNC206::pSM828)	-	-
RCR2011 Rif (pNC206::pSM367)	-	-
RCR2011 Rif (pNC206::pSM991-25)	+ ^a	-
RCR2011 Rif (pNC206::pSM991-32)	-	-

^a Nodule like structures

Nodule morphology

Rhizobium phaseoli wild type strains induce determinate

nodules. After twenty days of development the nodules are spherical in shape with well developed vascular bundles. Their external color is pink and they fix nitrogen actively (Figure 3). The light microscopy examination of transverse sections of mature nodules shows a central zone very rich in infected cells. Observations of the infected cells by electron microscopy revealed numerous peribacteroidal membranes enclosing large bacteroids with several poly- β -hydroxybutyrate granules. (Figure 6, panel A) [1]. In contrast, transconjugants of the pSym-cured strain carrying cosmids pSM991 or pSM927 induced green and white nodules, but similar in size and shape to those induced by the wild type strain (figure 3). Green and white nodules had a central zone with infected cells. Within the infected cells, only a few, small and deformed bacteroids which contained less poly- β -hydroxybutyrate granules than wild type bacteroids were found. Bacteria present in intercellular spaces were found more frequently in these nodules (figure 6).

DISCUSSION

In the present paper we report the isolation and characterization of two nodulation (nod) regions of the R. phaseoli symbiotic plasmid. These regions were sufficient to promote nodule induction, nodule development, bacterial release and host range determination in common bean. The two regions were separated by approximately 20 kb and both were contained in cosmid clones pSM991 and pSM927. Transconjugants of R. phaseoli pSym-cured strain which harbor these cosmids induced ineffective nodules on bean roots similar in size, shape and time of appearance to those induced by the wild type strain. These nodules had a central tissue with infected cells but, bacteroids within them, looked deformed and smaller than normal.

Cosmids pSM927 and pSM991 failed to elicit nitrogen fixing nodules probably because some genes associated with functions of an effective nodule are not included in these cosmids. Such is the case with the psi gene (polysaccharide-inhibition) located in a EcoRI fragment next to the EcoRI fragment containing the nifH of region c (cosmid pSM367, data not shown). Strains with a Tn5 insertion mutation in psi are unable to fix nitrogen [3,4].

Comparison between EcoRI restriction patterns of the two nodulating cosmids and deleted derivatives from cosmid pSM991, all which conserved nodulation abilities, showed that only three EcoRI fragments of 6.8 kb 3.5 kb and 0.5 kb are shared among them. Deletions lacking some of these bands were incapable of nodule induction.

The cosmid pSM991-25, a deletion derivative of cosmid pSM991 which restored nodulation ability to the pSym-cured strain, was mutagenized with MudII PR13 transposon. The analysis showed that insertions which abolished the symbiotic phenotype were clustered within the 6.8 EcoRI fragment and in the 3.5 EcoRI fragment. This approach demonstrated that these two regions were responsible of the symbiotic phenotype of cosmid pSM991.

Sequences homologous to the common nodABC genes were located in the EcoRI fragment of 6.8 kb in cosmid pSM991 which

contains nif region a corroborating a close linkage between nif and nod genes as described earlier [18,19]. Cosmid pSM991 was also able to complement R. meliloti Nod⁻ strains produced by three different Tn5 insertion in nodA, nodB and nodC genes, demonstrating an interfunctionality of these sequences. However, complemented strains showed a considerable delay in nodulation. This fact suggests some kind of functional divergence between the two gene clusters.

Transconjugants of wild type R. meliloti with cosmid pSM991 or with cosmid pSM991-25 were able to induce nodule-like structures on bean roots. Furthermore, pSM991-32, a deletion derivative of pSM991 which contains the nod region within the 6.8 kb EcoRI fragment but lacks the nod region in the EcoRI fragment of 3.5 kb, failed to induce these nodule-like structures indicating that host-range genes were located at least in part on the 3.5 kb EcoRI fragment.

The R. phaseoli strain CE-3 contains three EcoRI fragments of 5.2 kb, 4.9 kb and 3.4 kb which hybridize with the nodD probe. The first fragment was present in cosmids pSM367 and pSM991. The second fragment, in cosmid pSM828 which contains the nif region and the third one was located on the symbiotic plasmid, but absent in the cosmids described above. In the Rhizobium-legume system the product of nodD in conjunction with specific plant-factors present in the root exudates, regulate the expression of the nodABC genes [17,24,34]. Insertion mutations in nodD of R. leguminosarum and R. trifolii completely blocks nodulation [9,11]. However in R. meliloti in which three copies of nodD have been described a triple nodD mutant is required to observe a Nod⁻ phenotype [15]. The absence of nodD in cosmid pSM927 or insertion mutations in the EcoRI fragment which contains this gene in cosmid pSM991-25 did not impair the nodule development or the time of appearance of nodules in a R. phaseoli pSym-cured strain background. There are two possible ways to explain the nodulation capacity of cosmid pSM927. First, R. phaseoli does not require nodD gene for nodule induction and nodule development. Second, the nod genes of cosmid pSM927 are transcribed in a level sufficient to promote nodulation when carried on this cosmid. The construction of a triple nodD mutant and its test for nodulation on bean plants is required to support any of these alternatives.

The results described above suggest that only two regions were sufficient to replace the pSym itself of R. phaseoli for nodule development. One region included at least the common nodABC genes and the other region contains genes required in the host-range determination. These data are, in part, similar to those obtained for R. meliloti and R. leguminosarum in which clones basically containing the common nodABCD genes and the host-range genes induced nodules when they are introduced in their own pSym cured strain or pSym-deleted background and inoculated on the proper host [10,29,36].

The experiments of cosmid complementation on a pSym-cured strain do not exclude the participation of other genes located in the chromosome or in other plasmids on the development of a nitrogen-fixing nodule. In fact, in R. phaseoli CE-3 mutations which result in defective exopolisaccharide synthesis and a sym-

biotic phenotype similar to that of *R. meliloti* Exo⁻ mutants or mutations which alter lipopolisaccharide synthesis and an abnormal nodule development have been mapped in the chromosome [13,25,39]. Also, in the same strain a mutation which affect nitrogen fixation has been mapped in a plasmid (p42e) different than the pSym [23].

Acknowledgments :Supported in part by Consejo Nacional de Tecnología (CONACyT) grant PCCBBNA-022632, by US National Academy of Sciences/National Research Council by means of grant BNF-MX-68777 from the Agency for the International Development and by Fondo de Estudios Ricardo J. Zevada. We thank J.E. Padilla, L. Segovia and F. Sánchez for critical reading of the manuscript; J. Dénarié, E. Kondorosi and A. Pühler for providing plasmids and strains; J.L. Zitlalpopoca and A. Pichardo for technical assistance and M. D. Cuellar for secretarial support. M.A.C. was supported by a CONACyT fellowship.

REFERENCES

1. Baird LM and Webster BD: Morphogenesis on effective and in effective root nodules in *Phaseolus vulgaris* L.. Bot Gaz 143: 41-51, 1982.
2. Beynon JL, Beringer JE, Johnston AWB: Plasmid and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. J Gen Microbiol 120:421-429, 1980.
3. Borthakur D, Downie JA, Johnston AWB, Lamb JW: *psi*, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. Mol Gen Genet 200:278-282, 1985.
4. Borthakur D and Johnston AWB: Sequence of *psi*, a gene on the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* which inhibits exopolisaccharide synthesis and nodulation and demonstration thats its transcription is inhibited by *psr*, another gene on the symbiotic plasmid. Mol Gen Genet 207:149-154, 1987.
5. Boyer HW, Roulland-Dussoix D,: A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. Mol Biol 41:459-472, 1969.
6. Brom S, Martinez E, Dávila R, Palacios R.: Narrow and broad host-range plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. Appl Environ Microbiol. 54: 1820-1823.
7. Casadaban MJ: Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *E. coli* using bacteriophage lambda and Mu. J Mol Biol 104: 541-555, 1976.
8. Casadaban MJ: Fusion of the *Escherichia coli lac* genes to the *ara* promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions Proc Natl Acad Sci USA 72: 809-813.

9. Debelle F, Rosenberg C, Vasse J, Maillet F, Martinez E, Dénarié J, Truchet G: Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of Rhizobium meliloti. J Bacteriol 168: 1075-1086, 1986.
10. Djordjevic MA, Innes RW, Wijffelman CA, Schofield PR, Rolfe BG: Nodulation of specific legumes is controlled by several distinct loci in Rhizobium trifolii. Plant Mol Biol 6:339-401, 1986.
11. Djordjevic MA, Schofield PR, Rolfe BG: Mol Gen Genet 200:463-471, 1985.
12. Downie JA, Knight CD, Johnston AWB, Rossen L: Identification of genes and gene products involved in the nodulation of Peas by Rhizobium leguminosarum. Mol Gen Genet 198:255-262, 1985.
13. Figurski DH and Helinski DR: Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1648-1652, 1979.
14. Finnan TM, Hirsch AM, Leigh JA, Johansen E, Kuldau GA, Deegan S, Walker GC, Signer ER: Symbiotic mutants of Rhizobium meliloti that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40: 869-877.
15. Honma MA and Ausubel FM: Rhizobium meliloti has three functional copies of the nodD symbiotic regulatory gene. Proc Natl Acad Sci USA 84: 8558-8562, 1987.
16. Hooykaas PJ, Van Brussell AAN, den Dulk-Ras H, van Slogteren GMS, Schilperoort RA: Sym plasmid of Rhizobium trifolii expressed in different Rhizobium species and Agrobacterium tumefaciens. Nature (London) 291: 351-354, 1981.
17. Innes RW, Kuempel PL, Plazinsky J, Canter-Cremers H, Rolfe BG, Djordjevic MA: Plants factors induce expression of nodulation and host-range genes in Rhizobium trifolii. Mol Gen Genet 281: 426- 432, 1985.
18. Kondorosi E, Banfalvi Z, Kondorosi A: Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti: Identification of nodulation genes. Mol Gen Genet 193: 445-452, 1984.
19. Lamb JW, Downie JA, Johnston AWB: Cloning of the nodulation (nod) genes of Rhizobium phaseoli and their homology to R. leguminosarum nod DNA. Gene 34: 235-244, 1985.
20. Lamb JW, Hombrecher G, Johnston AWB: Plasmid-determined

- nodulation and nitrogen-fixation abilities in Rhizobium phaseoli. Mol Gen Genet 186: 449-452, 1982.
21. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.
 22. Masterson CL and Murphy PM: The acetylene reduction technique. In: Subba Rao NS (ed) Recent avances in Biological Nitrogen fixation. Edward Arnold, London, 1980, pp8-33.
 23. Morett E, Moreno S, Espin G: Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximide sensitive (MS⁼) mutants of Rhizobium phaseoli. Mol Gen Genet 200: 229-234, 1985.
 24. Mulligan JT and Long SR: Induction of Rhizobium meliloti nod exppression by plant exudate requires nod D. Proc Natl Acad Sci USA 82: 6609- 6613, 198
 25. Noel KD, Sánchez A, Fernández, L. Leemans J, Cevallos MA: Rhizobium phaseoli symbiotic mutans with transposon In5 insertions. J Bacteriol 158: 148-155, 1984.
 26. Noel KD, VadenBosch KA, Kulpaca B: Mutations in Rhizobium phaseoli that lead to arrested development of infection threads. J Bacteriol 168: 1392-1401, 1986
 27. Palacios R, Flores M, Martínez E, Quinto C: Rhizobium phaseoli: Nitrogen fixation genes and DNA reiteration. In Veerger c and newton WE (ed). Nitrogen Fixation Research Progress. Martinus nijhoff publishers. The Neetherlands. 1985, pp 173-179.
 28. Palacios R, Quinto C, de la Vega H, Flores M, Fernández L, Hernández M, Ballado T, Soberón G: General organization of nitrogen fixation genes in Rhizobium phaseoli. In Pühler A (ed) Molécular Genetics of the Bacteria-Plant Interactions. Springer, Berlin Herdelberg, New York, 1983, pp 164-168.
 29. Putnoky P and Kondorosi A: Two gene clusters of Rhizobium meliloti code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency. J Bacteriol 167: 881-887, 1986.
 30. Quinto C, de la Vega H, Flores M, Fernández L, Ballado T, Soberón G, Palacios R: Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature (London) 299: 724-726, 1982.
 31. Quinto C, de la Vega H, Flores M, Leemans J, Cevallos MA, Pardo MA, Azpiroz R, Girard ML, Calva E, Palacios R: Nitrogenase reductase: A functional multigene family in Rhizobium phaseoli. Proc Natl Acad Sci USA 82: 1170-1174,

1985.

32. Ratet P and Richaud F: Construction and uses of a new transposable element whose insertion is able to produce gene fusions with the neomycin-phosphotransferase-coding region of Tn903. *Gene* 42: 185-192, 1986.
33. Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F: Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti *Mol Gen Genet* 184: 36-333, 1981.
34. Rossen L, Shearman CA, Johnston AWB, Downie JA: The nod D gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and the presence of plant exudate induce nod ABC. *EMBO J* 4 3369-3373, 1985.
35. Schmidt J, John M, Kondorosi E, Kondorosi A, Wieneke U, Schröder G, Schröder J, Schell J: Mapping of the protein coding region of Rhizobium meliloti common nod genes. *EMBO J*: 3:1705-1711, 1984.
36. Schofield PR, Ridge WR, Rolfe BG, Shine J, Watson JM: Host specific nodulation is encoded on a 14 kb DNA fragment in Rhizobium trifolii. *Plant Mol Biol* 3: 3-11, 1984.
37. Simon R, Prierer U, Pühler A: A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnol* 1: 784-791, 1983.
38. Török I, Kondorosi E, Stepkowsky T, Pósfai J, Kondorosi A: Nucleotide sequences of Rhizobium meliloti nodulation genes. *Nucl Acid Res.* 12:9509-9504, 1984.
39. Truchet G, Rossenberg C, Vasse J, Julliot JS, Camut S, Dénarié J: Transfer of Rhizobium meliloti pSym genes into Agrobacterium tumefaciens: host-specific nodulation by atypical infection. *J Bacteriol* 153: 134-142, 1984.
40. VandenBosch KA, Noel KD, Kaneko Y, Newcomb EH: Nodule initiation elicited by noninfective mutants of Rhizobium phaseoli. *J Bacteriol* 162: 950-959, 1985.
41. Wacek T and Brill J: Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in soybean. *Crop Sci* 16: 519-522, 1976.

Table 1.

Plasmid or Bacterial strain	Relevant characters	Source or reference
Bacterial Strains		
<u>R. phaseoli</u> CE-3	str derivative of wild type strain CFN42, nod ⁺ Fix ⁺	[25]
CFN 2001	A Rif ^r derivative of CFN42 cured of p42a and p42d plasmids.	[28]
<u>R. meliloti</u> RCR 2011 Rif	Rif ^r derivative of RCR 2011 a Nod ⁺ .	[33]
GMI5382	<u>nodA::Tn5</u>	[9]
GMI5387	<u>nodB::Tn5</u>	[9]
GMI5383	<u>nodC::Tn5</u>	[9]
<u>E. coli</u> HB101	F ⁻ , <u>hdsS20</u> , <u>recA13</u> , <u>ara14</u> , <u>proA2</u> , <u>lacY1</u> , <u>galK2</u> , <u>rpsL20</u> , <u>xy15</u> , <u>mt11</u> , <u>supE44</u>	[5]
K802	<u>gal</u> , <u>met</u> , <u>SupE</u>	A. Pühler
MC4100(Mu <u>ots</u>)		[8]
M8820(Mu)		[8]
Plasmids		
pNC206	IncP1 Cbr Kmr	A. Pühler
pSUP205	cos Tcr Cm ^r ColE1	[37]
pRK2013	Kmr ColE1 Tra	[13]
pSM367	pSup205 containing <u>nif</u> region c	This work
pSM828	pSup205 containing <u>nif</u> region b	This work
pSM991	pSup205 containing <u>nif</u> region a	This work
pSM927	pSup205 containing <u>nif</u> region a	This work
pSM991-25	deletion of pSM991	This work
pSM991-15	deletion of pSM991	This work
pSM991-32	deletion of pSM991	This work
pSM991-36	deletion of pSM991	This work

Table 1.

Plasmid or Bacterial strain	Relevant characters	Source or reference
pSM991-82	pSUP205 containing a <u>EcoRI</u> fragment of 6.8 Kb with <u>nodABC</u>	This work
pSM991-40	deletion of pSM991 containing <u>EcoRI</u> fragment 5.2 kb	This work
pSM991-44	deletion of pSM991 containing <u>EcoRI</u> fragment 3.5 Kb	This work
pCQ12	pBR328 carrying a <u>EcoRI</u> fragment with <u>nif</u> region b	[30]
pKSK5	pRK290 carrying a 6.8 Kb <u>EcoRI</u> fragment with the common <u>nod</u> genes of pRm 41 b	[18]
Phages		
MudIIPR13	<u>lac</u> , <u>Cm^r</u> ,	P. Ratet

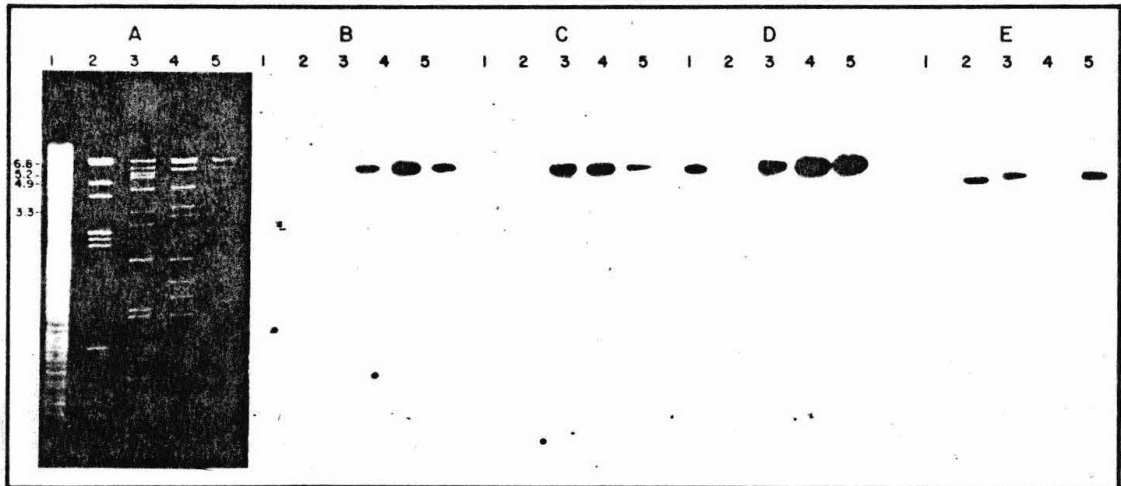


FIGURE 1. Localization of sequences of *Rhizobium phaseoli* homologous to the common *nodABCD* genes of *Rhizobium meliloti* by hybridization analysis. Molecular weights are indicated in kb. A, *Eco*RI patterns of DNA from CE 3 (lane 1), pSM828 (lane 2), pSM367 (lane 3), pSM927 (lane 4) and pSM991 (lane 5). B, hybridization patterns of the same DNAs against a *nodAB* detector. C, hybridization pattern against a *nodA* detector. D, hybridization pattern against *nodC* detector. E, hybridization pattern against a *nodD* detector. For isolation of detectors see Materials and Methods.

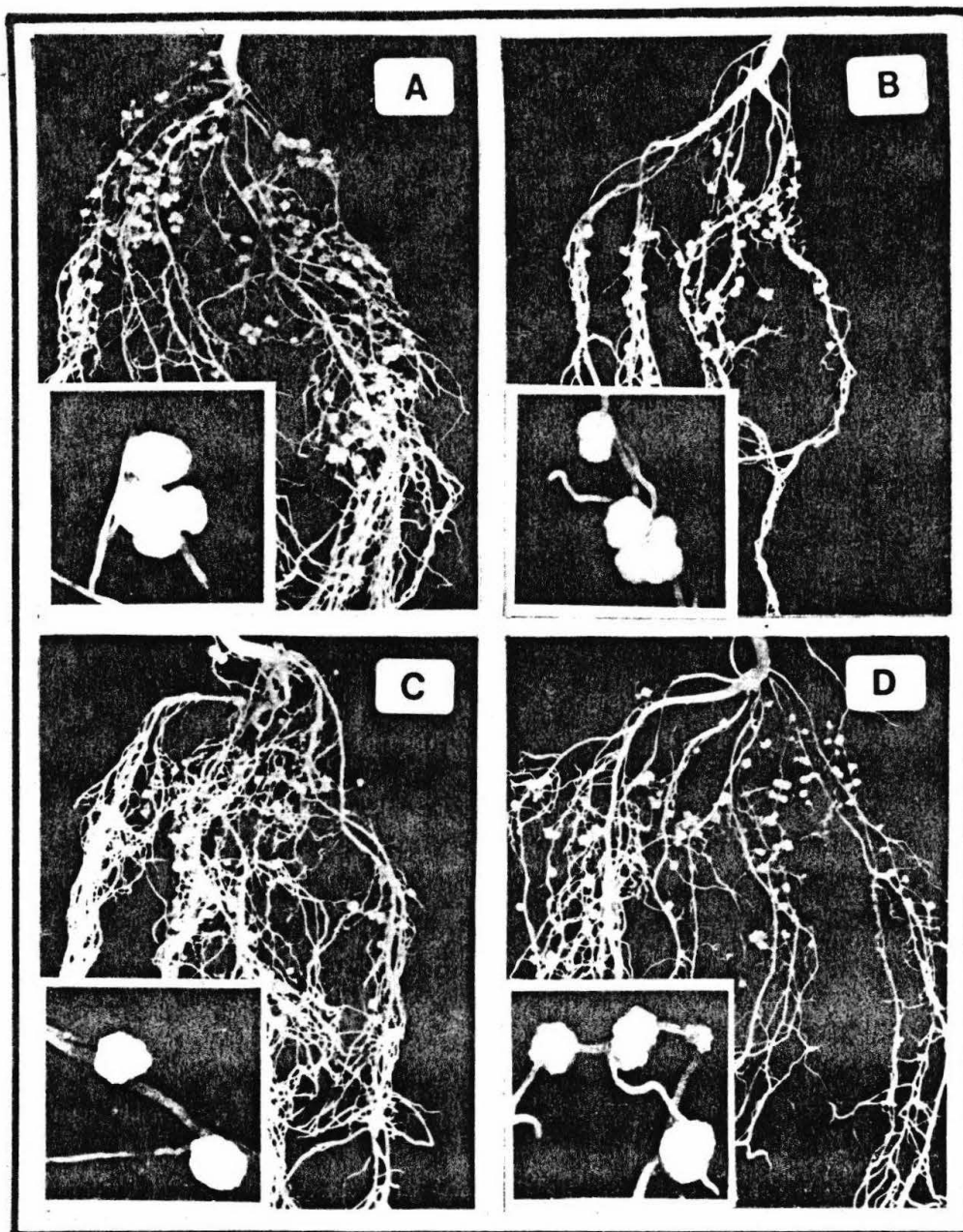


FIGURE 2. Twenty days old nodules of *P. vulgaris* induced by strain: A, CE 3. B, *R. phaseoli* pSym-cured strain (CFN 2001) carrying pSM991. C, CFN 2001 carrying pSM927. D, CFN 2001 carrying pSM991-25 (a deleted derivative of pSM991).

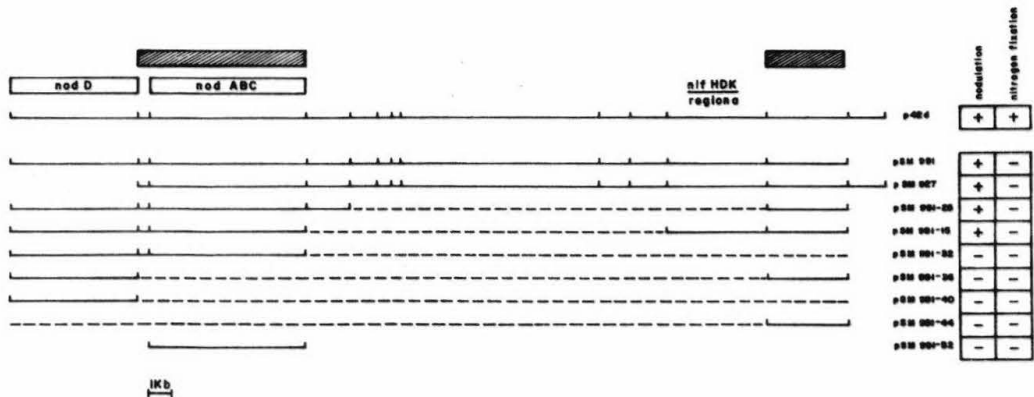


FIGURE 3. Physical map of the *nif* region a of the symbiotic plasmid p42d. Vertical bars represent *Eco*RI sites. Open boxes shows the localization of the *Eco*RI fragments which hybridized with the common *nod* genes of *R. meliloti*. Regions cloned in cosmids are shown below. Sequences eliminated in derivatives of cosmid pSM991 are indicated by broken lines. Table shows the symbiotic phenotype of cosmids in a pSym-cured strain and tested on bean plants. Dashed boxes indicate the *Eco*RI fragments shared by cosmids and deleted derivatives which induce nodules on bean roots in the same background. For cosmid clones see Table 1.



FIGURE 4. Restriction endonuclease map and location of MudII PR13 insertions within cosmid pSM991-25. Insertion mutants which results in a Nod⁻ phenotype are indicated by closed circles. Open circles indicate insertion mutants with a Nod⁺ phenotype. E, EcoRI. B, BamHI.

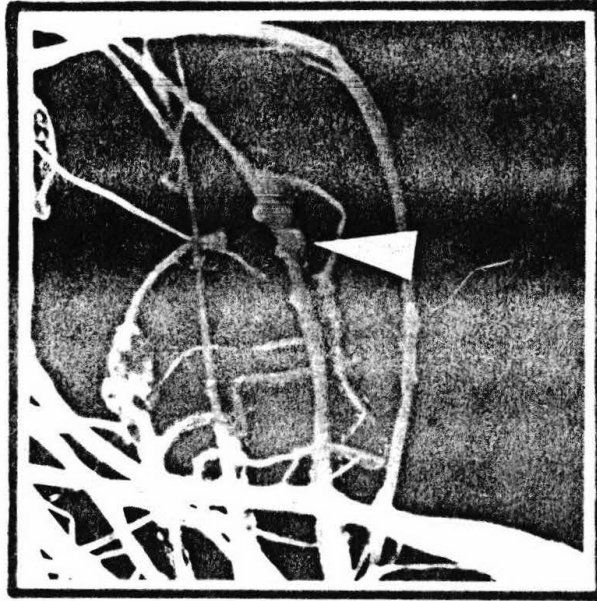


FIGURE 5. Roots of *P. vulgaris* twenty days after inoculation with a *R. meliloti* strain carrying cosmid pSM991. The photograph shows nodule like structures (one of them indicated by the triangle).

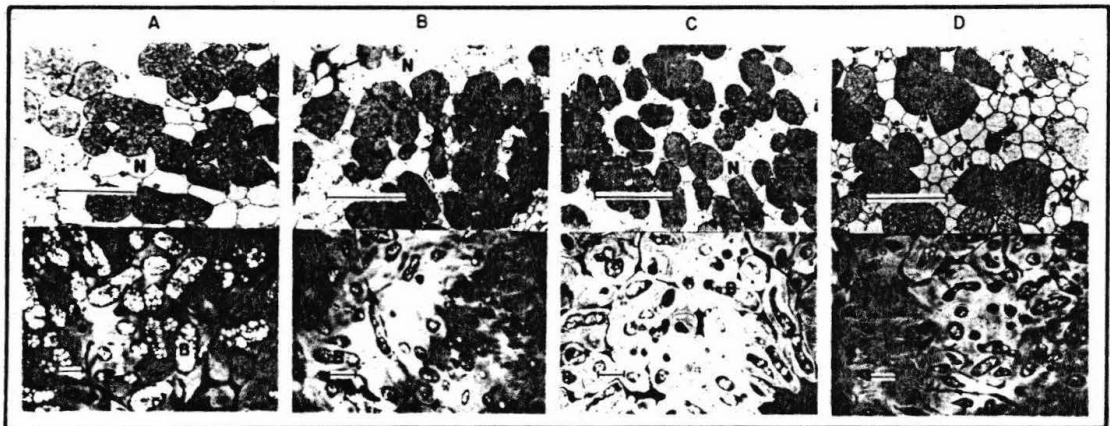


FIGURE 6. Micrographs from twenty days old nodules of *P. vulgaris* induced by strains: A: CE 3; B: CFN 2001 containing cosmid pSM991; C and D: CFN 2001 containing cosmids pSM927 and pSM991-25 respectively. Upper part of panels show light micrographs. Bar represents 40 μ m. Lower part of panels show transmission electron micrographs. Bar represent 2.5 μ m. Letters indicate: B, bacteroids; I, infected cell; N, non-infected cell; T, intercellular space occupied by bacteria.

ANEXO

Antes de concluir este trabajo de tesis me gustaria esbosar brevemente aquellos experimentos que se ocurren que sean importantes para redondear el trabajo o se contemplen como una consecuencia natural del mismo.

En la parte precedente se describen dos regiones clonadas en los cosmidos pSM991 y pSM927 que son condición suficiente y necesaria para para inducir nódulos en frijol cuando estos cosmidos se encuentran en una cepa de R. phaseoli que carece de su plásmido simbiótico.

La primera pregunta que surge es si al sacar estas regiones del contexto regulatorio del resto del plásmido simbiótico, las transconjugantes ahora induzcan nódulos por una "vía" de genes diferente a la usada en la condición silvestre. Un ejemplo podría ser que estas regiones se encuentren bajo el control de moduladores negativos ausentes en los cosmidos pero presentes en el resto del plásmido simbiótico. Otra posibilidad es que en el plásmido simbiótico existan secuencias que puedan substituir funcionalmente a las presentes en los cosmidos pSM991 y pSM927. Una manera de abordar estas cuestiones es homogenotizar la cepa silvestre con algunas de las mutaciones obtenidas en las regiones necesarias para la nodulación, que se encuentran en el cosmido pSM991-25, esperando que de ser realmente necesarias para la nodulación el fenotipo de estas mutaciones, en el fondo génico de la cepa silvestre, sea el mismo que presenta la cepa curada con el cosmido mutado.

En otro orden de cosas, es posible determinar con precisión aquellas secuencias presentes en el cosmido pSM991 que son capaces de conferir la capacidad de nodular frijol a una cepa que antes no nodulaba frijol pero si nodula otras leguminosas. Para ello Martha Vázquez ha elegido como cepa receptora a la ANU280 que es una cepa de amplio espectro pero que no puede nodular al frijol. La elección de esta cepa me parece mas adecuada que la cepa de R. meliloti utilizada anteriormente puesto que las exigencias de esta especie en lo que se refiere a hospedero son mucho mayores que los de una cepa de amplio espectro. Además, los genes de especificidad de R. meliloti suelen ser dominantes sobre los de otras especies. Una de las estrategias de Martha para aislar las secuencias que determinan la especificidad consisten introducir a la ANU280 diferentes fragmentos EcoRI presentes en el cosmido pSM991 en diferentes combinaciones hasta hallar el o los fragmentos EcoRI que le permiten a la ANU280 nodular frijol. El segundo paso consistirá en saturar de mutaciones los fragmentos EcoRI involucrados para así determinar con mas exactitud las secuencias que participan en el fenómeno.

Por último, el determinar cual es el papel que juegan los genes nodD en R. phaseoli es de primordial importancia para entender las primeras interacciones R. phaseoli-frijol.

Como ya he descrito existen tres secuencias que se reconocen por su hibridización con un detector heterologo de R meliloti que porta el gene nodD. Sin embargo, el papel y funcionalidad de estas secuencias es poco claro debido a que el cosmido pSM927 es capaz de nodular frijol aún sin la presencia de genes nodD cuando se encuentra dentro de una cepa que carece de su plásmido simbiótico. Esto puede ser debido a que el nivel de transcripción de escape de los genes nod que se encuentran en el cosmido es suficiente para promover la nodulación.

Por otra parte, se sabe gracias a los datos aportados por Herman Spaink que en la cepa CE-3 existen genes cuyos productos en presencia de flavononas como la naringenina o isoflavonoides como daizeina inducen fuertemente la transcripción de una fusión lac en los genes nodABC de R. leguminosarum. El mismo investigador nos comunico que el gene nodD presente en las transconjugantes de la cepa CFN2001 que portan los cosmidos pSm991 o pSM367 es capaz de promover la transcripción de la fusión antes mencionada, sin embargo, a un nivel menor que el observado en la cepa silvestre. Esto permite concluir que no es necesaria la máxima inducibilidad de los genes nodABC para obtener un nódulo.

Por el mismo tipo de experimentos sabemos que la secuencia que tiene homologia con nuestro detector nodD, que se encuentra adyacente a la region nif c, no tiene ningun papel en la inducción de los nodABC. Todo indica que la máxima inducibilidad en la cepa silvestre es debido a la participación de otros productos diferentes al gene nodD contenido en el cosmido pSM991. Uno de estos productos bien puede ser el codificado por el gene nodD restante, pero no se excluye la participación de otros genes y sus productos en la inducibilidad de los nodABC.

Para tener una imagen mas clara del papel de estos genes es necesario construir una cepa que tenga interrumpido con interposones las tres secuencias con homologia con nodD y probar su fenotipo simbiótico en frijol.