

Catalogar y digitalizar

CFN51

TD

1985

Ej. Un.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

REITERACION DE LAS SECUENCIAS DE NITROGENASA
Y ESPECIFICIDAD DE RHIZOBIUM PARA NODULAR Y
FIJAR NITROGENO EN PHASEOLUS VULGARIS.

Ma. Esperanza Martínez Romero

CUERNAVACA, MOR.

1985.

759619
D



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A GILLES

Agradezco a todos mis profesores sus enseñanzas y su -
amistad, en especial al Dr. Rafael Palacios por su gran
apoyo y confianza, al Dr. Jaime Mora, al Dr. Federico
Sánchez, al Dr. Fernando Bastarrachea, a la Dra. Alejan-
dra Covarrubias, al Dr. Guillermo Dávila, al Dr. Romi--
lio Espejo, al Dr. José Negrete, al Dr. Daniel Piñeiro,
al Dr. Jorge Soberón.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio su colabora-
ción, a Marco, a Magie, a Carmen Quinto, a Yola, a Sol,
a Lorenzo, a Mac, a Victor, a Araceli, a Lupita, a En-
rique, también a Alejo, a Eduardo, a Lucy, a José Luis
Citlalpopoca, a Chuy y a todo el personal del CIFN, que
ha contribuído a la realización de mi trabajo.

INDICE	páginas
Introducción	
El contexto y algunas ideas	1
Los móviles del proyecto	17
Materiales y métodos	19
Resultados	
Artículo	22
<u>In Addendum</u>	34
Discusión	40
Cuadros 1-3	49
Tablas 1-5	52
Figuras 1-14	57
Apéndice	68
Referencias	77

UNA INTRODUCCION

EL CONTEXTO Y ALGUNAS IDEAS

Del mundo viviente sólo algunos procariotes saben utilizar el nitrógeno atmosférico y transformarlo en amonio. Esta capacidad para fijar nitrógeno se encuentra distribuída en diferentes grupos de bacterias y no se correlaciona con la filogéⁿia de las mismas. En el cuadro 1 presento una construcción filogenética elaborada con datos taxonómicos que toman en cuenta -- diferentes criterios (aerobiosis vs. anaereobiosis, fermentación de carbohidratos, comparación de RNA ribosomales, de citocromos; Fox et al., 1980, Schwartz y Dayhoff, 1978, Kluntzel et al., 1981, Demoulin, 1979). En el cuadro 1 se muestran algunas de las especies fijadoras de nitrógeno. Se observa que -- existen bacterias fijadoras clasificadas como parientes cercanos a bacterias que no fijan nitrógeno. Esto podría sugerir -- que ha habido transferencia lateral de la información para fijar nitrógeno entre distintas bacterias. Sin embargo no se -- descarta la posibilidad de que un ancestro común tuviera esta información y que se haya perdido en algunas líneas.

Las bacterias tienen diferentes modalidades para fijar nitrógeno, unas pueden fijar nitrógeno por sí mismas independientemente de otro ser vivo (fijadores libres), de éstas algunas son anaerobios estrictos (Clostridium, Desulfovibrio, etc.) o facultativas (Klebsiella, Bacillus, Escherichia, etc.), microaerofílicos (Rhizobium de crecimiento lento, Mycobacterium); fotótrofos (facultativos, microaerofílicos y aeróbicos: Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Anabaena, Nostoc, Gleocapsa, etc.) (Postgate, 1978). Otras bacterias se especializaron para fijar nitrógeno en simbiosis con diferentes familias de plantas.

Del paquete genético que tiene como consecuencia última - la fijación de nitrógeno, la información genética más conservada es la que codifica para la enzima nitrogenasa. Esta consiste de dos componentes. El componente I es el que lleva a cabo la reducción de nitrógeno a amonio, contiene Fe y Mo como factores y está compuesto por dos proteínas distintas. El componente II (nitrogenasa reductasa), es un dímero de subunidades idénticas (PM. 32,000 c/u) que contiene fierro y azufre y es el donador de electrones del componente I. (Mortenson y Thornelly, 1979). Los componentes I y II purificados de diferentes organismos pueden intercambiarse para obtener nitrogenasas híbridas activas (datos revisados por Brill, 1980). La homología entre nitrogenasas de diferentes organismos es cierta a nivel de la secuencia nucleotídica, (cuadro 2) de la secuencia de aminoácidos (Ruvkun y Ausubel, 1980; Quinto et al, 1985) y de su reactividad inmunológica (Maier y Brill, 1976).

Otra característica común de las nitrogenasas es su sensibilidad al oxígeno. Para evitar la inactivación irreversible de la nitrogenasa, los organismos cuentan con diferentes estrategias para la separación física o temporal de los procesos aeróbicos y de la fijación de nitrógeno. Para citar algunos ejemplos, existen quistes especializados en fijar nitrógeno intercalados en las cadenas de algas filamentosas como Anabaena; Azotobacter disminuye la concentración de oxígeno mediante su misma respiración y sólo fija nitrógeno en una etapa posterior. También se propone que algunas bacterias como Beijerinckia excretan polisacáridos hasta formar colonias mucilaginosas en las cuales la difusión de oxígeno está limitada, lo que les permite fijar nitrógeno (Postgate, 1978).

Las bacterias como Rhizobium y los Actinomicetales que establecen simbiosis con plantas, encuentran protección dentro de los nódulos que forman en ellas. La planta contribuye sintetizando la globina de la proteína "leghemoglobina" que regula la tensión de oxígeno y previene la inactivación de la nitrogenasa. (Appleby, 1974).

La nitrogenasa y la regulación de su expresión han sido primordialmente estudiadas en fijadores libres como Klebsiella pneumoniae (Ausubel y Cannon, 1981, Espín et al., 1982, -- Dixon et al., 1984, entre otros).

Las características intrínsecas de la fijación simbiótica de nitrógeno requieren para su estudio, además del conocimiento de la organización y regulación de los genes estructurales de la nitrogenasa, otro enfoque que tome en cuenta las interacciones entre la planta y la bacteria. Estas interacciones que culminan con el establecimiento de un nódulo fijador de nitrógeno, las revisaré más adelante. En este punto procederé a presentar al macrosimbionte: la planta. No incluyo la revisión de la simbiosis que forman algas cianofíceas con plantas multicelulares desde briofitas a angiospermas. Sólo mencionaré que el único caso estudiado en el cual la alga penetra a la célula del huésped es el de la simbiosis Gunnera-Nostoc (Silvester, 1976).

Las angiospermas o plantas con flores, que pueden considerarse como las plantas dominantes en el mundo actual, incluyen entre 300 a 400 familias con 300,000 especies (Taylor, 1981). Una familia, la de las leguminosas, que es después de las familias Orquidaceae y Compositae, la familia más grande de las angiospermas consta de unas 18,000-19,000 especies (Allen y Allen, 1981; NAS, 1979). Se han descrito poco más de 2800 especies de leguminosas que forman nódulos (Allen y Allen, 1981).

De las tres subfamilias de leguminosas se considera que la más antigua es la de las Caesalpinioideas (Heywood, 1971), a diferencia con las otras dos subfamilias, de ésta sólo el 30% de las especies examinadas tienen nódulos (Allen y Allen, 1981).

El tiempo de origen de las leguminosas se desconoce, restos fósiles indican la presencia de caesalpinoideas y mimosoideas hace 70 millones de años, lo que indica que la familia es seguramente más antigua. Parece haberse ampliado y diversificado hace 54-34 millones de años. Existe la hipótesis de que el origen primero, el sitio de radiación y evolución temprana de las leguminosas fue Africa. Al final del cretácico (hace 65 millones de años) cuando muchos grupos de leguminosas modernas estaban surgiendo Eurasia estaba en contacto con Africa y con América del Norte. Cuando los principales grupos de leguminosas estaban diferenciándose, Sudamérica, Africa y Norteamérica estaban separados unos 1,200 Km entre sí (Raven y Polhill, 1981).

Las subfamilias Caesalpinoideae y Mimosoidea se encuentran localizadas en áreas tropicales y subtropicales. De la familia Papilonoidea, más grande y más reciente que las otras dos, de distribución tropical y templada (Heywood, 1971), el 98% de las especies examinadas se han encontrado con nódulos (Allen y Allen, 1981).

La taxonomía de las leguminosas se basa principalmente en criterios morfológicos dando especial importancia a las estructuras reproductivas. (Heywood, 1971, Polhill et al., 1981). Los esfuerzos actuales de clasificación se valen de herramientas de fitoquímica (Gómes et al., 1981), de biología molecular (Preisler y Thompson, 1981; Martin y Jennings, 1983), de inmunología (Cristofolini, 1981) y de microscopía (Goldblatt, 1981). Sin embargo estos criterios sólo han sido aplicados a un pequeño número de especies. En general, salvo pequeñas excepciones, estos criterios más modernos de clasificación concuerdan con los criterios clásicos.

Además de las leguminosas, existen otras ocho familias de angiospermas, de las cuales alrededor de 200 especies pueden formar asociaciones simbióticas con organismos fijadores de nitrógeno (Akkermans et al., 1984). Un género, Parasponia, de la - -

tablecer simbiosis con Rhizobium (aspectos revisados por Gresshoff et al., 1984).

Las otras familias entre las que se cuentan Casuarinaceae, Rosaceae, Rhamnaceae, Myricaceae entre otras, fijan nitrógeno en simbiosis con bacterias gran positivas del tipo de los actinomicetos (v.g. Frankia). Las especies de plantas fijadoras de nitrógeno en estas familias se encuentran muy dispersas intercaladas entre especies que no fijan nitrógeno (Bond, 1976).

La simbiosis de las no leguminosas no ha sido tan estudiada como la de las leguminosas. Hasta hace muy poco se logró cultivar en el laboratorio al actinomiceto; también se ha encontrado hemoglobina en los nódulos de algunas especies y la ultraestructura de los nódulos revela semejanzas con los nódulos de las leguminosas (revisión de Akkermans et al., 1984).

El encontrar procesos simbióticos en diferentes familias de angiospermas ha sido considerado, por algunos, como casos de evolución convergente (Appleby et al., 1983). Por otra parte se encontró que la hemoglobina de los nódulos de Parasponia tiene homología con la leghemoglobina de las leguminosas, en cuanto a la secuencia nucleotídica parcial (Gresshoff et al., 1984) lo que hace pensar en un origen común de este componente simbiótico.

Tomando en cuenta todas las especies descritas que establecen simbiosis con Rhizobium o con actinomicetos, llama la atención que sólo un 1% aproximadamente de todas las especies angiospermas desarrollaran la capacidad de asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno. Si se considera que de las demás especies no examinadas de Papilionoides y Mimosoideas el 98% y 90% (como está descrito para las especies examinadas respectivamente) pueden formar nódulos, aumentaría del 1% al 5% las especies con fijación de nitrógeno.

Por otra parte, ninguna leguminosa puede obtener el 100% del nitrógeno que requiere por la fijación de nitrógeno. Se estima - que la soya obtiene alrededor del 30% del nitrógeno por simbiosis, el frijol 20 - 40% (Núñez et al., 1979) y por selección de alfal-
fas con mejor capacidad para fijar se ha aumentado de un 8-56% a un 65% (Heichel et al., 1981). El resto del nitrógeno que requie-
ren las plantas lo obtienen normalmente del suelo o de fertili-
zantes añadidos. Se ha reportado que para diferentes tipos de sue-
lo el nitrógeno contenido en el humus varía desde 3.2 (en prome-
dio) hasta 35.8 ton /ha. tomando en cuenta una profundidad de
20 cm (Flaig et al., 1977). El nitrógeno se vuelve asimilable me
diante la mineralización de esta materia orgánica, la cual pro-
porciona de 20-100 kg. aproximadamente de amonio o nitrato por
ha/año (Westermann et al., 1981).

Otro tipo de reportes indican que las plantas con fijación de nitrógeno poseen ciertas ^{des}ventajas. Hay un menor desarrollo de las raíces de soya y Vigna noduladas en comparación con -
plantas no noduladas (Munns, 1980), esto también sucede en frijol (observaciones personales). Un menor desarrollo de la raíz dificulta la absorción de fosfato y agua cuando estos es
tán limitantes. Plantas de trébol noduladas son más sensibles a la limitación de agua (DeJong y Phillips, 1982), así mismo plantas de soya dependiendo de la fijación de nitrógeno requie-
ren 20% más de superfosfato para alcanzar el 90% del rendimien-
to de plantas crecidas con fertilizante nitrogenado (Munns, 1980). Estas desventajas aunadas a la disponibilidad de amonio y/o nitrato en el suelo tal vez expliquen que la fijación de nitrógeno no se haya optimizado ni que exista una mayor propor-
ción de plantas con fijación de nitrógeno. El proceso de for-
mación de los nódulos fijadores de nitrógeno ha sido estudiado desde diferentes puntos de vista en varias leguminosas. El primer punto de interacción entre el Rhizobium y la leguminosa es la rizosfera, allí el Rhizobium crece en pequeños parches independientes adheridos al mu

cilago de la raíz (Dazzo, 1979) estimulado por los carbohidra-
tos, vitaminas y aminoácidos que excreta la leguminosa (Rovi-
ra, 1969). Además de Rhizobium otros microorganismos se adhie-
ren y crecen en la raíz, y Rhizobium mismo puede proliferar -
en raíces de cereales (Schmidt, 1979).

- Después de la colonización en la rizosfera, Rhizobium -
procede a penetrar a la raíz. El modo de penetración parece -
depender de la planta. Mucha atención ha recibido la invasión
a través de hilos de infección (Callahan y Torrey, 1981; Hi--
gashi y Abe, 1980) ya que este es el modo de entrada del rhizo-
bium a las leguminosas cuya simbiosis más se ha estudiado - -
(chícharo, trébol y alfalfa). Una misma bacteria puede inva--
dir una planta (Ornithopus) mediante un hilo de infección y -
otra (Lupinus) por medio de una herida e invasión celular. -
(Dart, 1977; Newcomb, 1981).

En Neptunia, una leguminosa acuática, que no posee pelos
radiculares, Rhizobium entra a través de las células epidérmicas
(Schaede, 1940). Rhizobium penetra al cacahuate (Arachys-
hypogea) a través de los espacios intercelulares que se acen-
túan cuando emergen las raíces laterales (Dazzo, 1979). En -
Phaseolus lunatus se ha descrito penetración a través de cé-
lulas epidérmicas y formación de hilos de infección en esas -
células, además de la infección a través de los pelos radicu-
lares. (Bal y Wong, 1982).

- Una vez que la bacteria gana acceso a la planta y encuen-
tra las células blanco a las que penetra (que pueden variar -
dependiendo de la planta), comienza un proceso de diferencia-
ción de la bacteria a bacteroide (la forma activa en fijación
de nitrógeno) y de estimulación meristemática del tejido vege-
tal, cuyo resultado lleva a la formación del nódulo, un tejido
vascularizado altamente estructurado (con diferentes modalida-
des). Es la forma de bacteroide de Rhizobium en la que se in-
duce la síntesis de nitrogenasa la cual transforma el nitróge-
no a amonio. Este es excretado hacia el citoplasma vegetal y -

ahí es transformado por enzimas vegetales en compuestos nitrogenados que se transportan al resto de la planta.

La morfología de los nódulos y el número de éstos son - - características dictadas por la planta. Hay intentos de correlacionar la morfología del nódulo con las líneas evolutivas de las leguminosas (Sprent, 1981). Esta correlación no es sencilla, sin embargo resultan muy interesantes las implicaciones fisiológicas y ecogeográficas que se pueden atribuir a las diferentes morfologías de los nódulos (Sprent, 1981).

Además de establecer nódulos en las raíces, Rhizobium, - puede formar nódulos en los tallos de algunas especies como Sesbania y Aeschynomene. La fijación de nitrógeno en el tallo es interesante ya que las células vegetales del nódulo son - fotosintéticas y además, la fijación no se inhibe por nitrato, a diferencia con el caso de la raíz (revisión por Dommergues, 1984).

Nemátodos, herbicidas (Allen y Allen, 1981) y cepas de - Rhizobium con algunos defectos metabólicos (que no penetran a las células vegetales, Dénarié et al., 1976) promueven la formación de estructuras semejantes a nódulos o "pseudonódulos". Esto ha llevado a pensar que Rhizobium es el disparador de - una respuesta del vegetal y que aprovecha mecanismos ya existentes en la planta para la formación de los nódulos fijadores de nitrógeno (Long, en prensa).

En el nódulo Rhizobium recibe a cambio del amonio, fotosintato en forma de diferentes compuestos tricarbónicos. Se han visto incrementos en la concentración del Rhizobium específico en el suelo donde se cultiva la leguminosa a la cual - nodula. (Nutman y Ross, 1969). Las ventajas que tiene Rhizo-

bium en el nódulo se han cuestionado debido a que existe controversia sobre la viabilidad de los bacteroides. Se había reportado un 90% de viabilidad de los bacteroides de R. trifolii (Gresshoff 1977), sin embargo Zhou et al., (1984) encuentran que los bacteroides maduros de R. trifolii son incapaces de reproducirse contrastando con los bacteroides de R. japonicum, que no son formas terminales de diferenciación y que son capaces de reproducirse.

El Manual de Bergey define a las bacterias del género Rhizobium como bacterias gram negativas, con flagelos, capaces de nodular leguminosas (Buchanan y Gibbons, 1974). Las especies de Rhizobium se definen de acuerdo a la planta a la que infectan. Esta forma de clasificar a las bacterias, si bien operativa, resultó ser irreal, pues agrupa en un género bacterias que por otros criterios resultan muy diferentes. Así, los rhizobia de crecimiento lento (R. japonicum, R. lupini y R. cowpea, que nodulan soya, lupinus, y algunas variedades de plantas tropicales respectivamente) son tan distintos de los de crecimiento rápido (R. meliloti, R. trifolii, R. leguminosarum y R. phaseoli, que nodulan alfalfa, trébol, chícharo y haba y frijol respectivamente) que se ha propuesto que se considere como un género distinto, Bradyrhizobium (Graham, 1964; Elkan, 1984), más parecido a Pseudomonas que a Agrobacterium y a Rhizobium (Moffett y Coldwell, 1968).

Para la clasificación de las especies de Rhizobium se toma en cuenta sólo el 0.5% de las especies de leguminosas. Se había considerado que el resto de las leguminosas formaban simbiosis con una miscelánea de cepas de crecimiento lento - denominadas "cowpea" (Graham, 1976). Actualmente se reconoce un grupo de Rhizobium de crecimiento rápido que nodula leguminosas tropicales como Sesbania, Leucaena y Lab-lab, Elkan (1984) propone que este grupo se denomine R. loti. Se considera que estas últimas bacterias forman un grupo intermedio entre el Rhizobium de crecimiento rápido y el de crecimiento --

lento ya que presentan características de ambos grupos (Broughton, 1984; Stowers y Eaglesham, 1983).

La clasificación de Rhizobium se enfrenta al problema de la inoculación cruzada o capacidad de Rhizobium para nodular especies de plantas que normalmente son noduladas por otro tipo de Rhizobium (Lange, 1961; Graham, 1976). Un ejemplo son las cepas aisladas de nódulos de Parasponia (la no leguminosa que forma simbiosis con Rhizobium) que pueden nodular y fijar N en seis diferentes especies de leguminosas. (Trinick, 1973; Gresshoff, 1984).

Se ha encontrado diversidad en las cepas que pueden nodular efectivamente (fijar N) a una misma planta. Así, R. phaseoli se ha descrito como un grupo heterogéneo de bacterias con base en diferentes criterios: patrones de proteínas (Roberts et al., 1980), resistencia a antibióticos (Beynon y Josey, 1980), taxonomía numérica (Graham, 1964, White, 1972, Catteau, 1984) y patrones de plásmidos (Martínez y Palacios, 1984). Por homología de ADN se encontró que R. japonicum puede dividirse en tres subgrupos distintos (Hollis et al., 1981). Se han descrito cepas de Rhizobium de crecimiento rápido capaces de establecer simbiosis con soya (Keyser et al., 1982). Este R. japonicum de crecimiento rápido es más semejante a los otros rhizobia de crecimiento rápido en cuanto a utilización de carbohidratos y a otras pruebas bioquímicas que al R. japonicum de crecimiento lento con el que tiene en común la capacidad de nodular soya (Keyser et al., 1982). R. trifolii que nodula especies asiáticas de trébol es muy diferente, por homología de ADN, al R. trifolii de los tréboles europeos. (Crow et al., 1981).

Por los datos antes expuestos, se puede pensar que la información ad hoc para nodular efectivamente una cierta planta puede expresarse en diferentes contextos genéticos. En Rhizobium, al igual que en otras bacterias que interaccionan con plantas, como Agrobacterium, Erwinia y Pseudomonas, se han encontrado diversos plásmidos, algunos de gran tamaño (Nutti et

al., 1977; Currier y Nester, 1976; Nester, 1981). La información genética para nodular y fijar N en los rhizobia de crecimiento rápido se encuentra codificada en plásmidos (plásmido "Sim" o simbiótico) (Higashi, 1967; Zurkowski y Lorkiewicz, 1978; Zurkowski, 1981; Rosenberg et al., 1981; Banfalvi et al., 1981; Hooykaas et al., 1982). Estos plásmidos pueden transferirse de una bacteria a otra confiriendo a la receptora la especificidad para nodular y, en algunos casos para fijar nitrógeno, que tenía la bacteria donadora. Como receptoras se han utilizado cepas de la misma especie "curadas" del plásmido simbiótico u otras especies de Rhizobium que llevan plásmidos simbióticos con otra especificidad o cepas de Agrobacterium (Agrobacterium produce tumores en plantas, Rhizobium y Agrobacterium son los dos géneros de la familia Rhizobiaceae).

Algunos de estos plásmidos se transfieren a alta frecuencia como el pJB5J1 de R. leguminosarum. Este plásmido al transferirse a R. phaseoli le confiere la capacidad de nodular chícharo efectivamente, al transferirse a R. trifolii y a Rhizobium spp (cowpea) les permite nodular y en cierto porcentaje (20%) de bacterias transconjugantes también fijar nitrógeno (Johnston et al., 1978). También el pJB5J1 ha sido transferido tanto a cepas de R. meliloti curadas del plásmido "Sim" y a una cepa de Agrobacterium curada del plásmido Ti (que lleva la información para producir tumores). A ninguna de las dos cepas le confiere la capacidad para nodular ni chícharo ni otras plantas. (Djordjevic et al., 1983). Otros plásmidos simbióticos de R. leguminosarum también se han transferido a otras especies de Rhizobium y a Agrobacterium. La transferencia del pSym 1 de R. leguminosarum RCC1001 a R. trifolii, a R. meliloti y a Agrobacterium, permite la nodulación de plantas del grupo de inoculación de chícharo, sólo los nódulos formados por R. trifolii con el pSym 1 fijaron nitrógeno (Hooykaas et al., 1982) Agrobacterium con otro plásmido Sim de R. leguminosarum tiene un rango de huéspedes más estrecho de nodulación que rhizobia con el mismo plásmido (Van Bruseel et al., 1982).

De R. trifolii también se han transferido plásmidos simbióticos a R. phaseoli (Higashi, 1967) y a diferentes cepas de R. leguminosarum, algunas eran mutantes en nodulación o fijación (Hooykaas et al., 1981). En estas transconjugantes ningún plásmido de R. leguminosarum se perdió, y se obtuvo nodulación y fijación tanto en trébol como en haba (grupo de inoculación de R. leguminosarum). El plásmido en cuestión de R. trifolii, pTr5a, no complementa a una mutante de nodulación (nod^-) de R. leguminosarum y aunque la transconjugante nodula trébol, no nodula chícharo. pTr5a confiere a Agrobacterium la capacidad para formar hilos de infección, penetrar a las células vegetales y formar nódulos que no fijan nitrógeno (Hooykaas, 1981). Otro plásmido de R. trifolii, pPN1, afecta la respuesta simbiótica de las células receptoras tanto para trébol como para la leguminosa huésped original. Las alteraciones en las respuestas simbióticas de R. leguminosarum y R. phaseoli se debieron a la pérdida del plásmido simbiótico original de estas cepas. En una cepa de R. meliloti, el plásmido simbiótico original se pierde por la presencia del pPN1, sin embargo estas cepas son incapaces de nodular tanto alfalfa como trébol. La fijación de nitrógeno de R. loti se inhibe tanto en Lotus (su huésped) como en trébol por el pPN1 (Ronson y Scott, 1983). Este último efecto se ha llamado "incompatibilidad fisiológica".

El plásmido Sim de R. meliloti es mayor de 700 Kb, mientras que en los otros rhizobia su tamaño varía entre 160 y 500 Kb. No obstante su gran tamaño que dificultaba su transferencia a otras especies, los grupos de Kondorosi (1982) y Dénarié (1984) lograron movilizarlo a Agrobacterium. En ambos casos los nódulos son inefectivos y la microscopía reveló un proceso atípico de penetración, sin hilos de infección y nódulos desprovistos en gran parte de bacterias (Truchet et al., 1984).

— El enfoque de movilización de plásmidos considera a éstos como entidades unitarias. Un enfoque más estructural, en el que se comparan plásmidos simbióticos de R. meliloti de diferentes orígenes geográficos, muestra que la homología se extiende sólo a ciertas regiones discretas del plásmido. (Huguet et al., 1983). Esta homología abarca a menos de un cuarto de cada -- plásmido en promedio.

Además de las exhaustivas transferencias de plásmidos entre diferentes bacterias y de la comparación estructural de algunos plásmidos simbióticos, otra de las estrategias para caracterizar los paquetes simbióticos ha sido la obtención de mutantes en nodulación y fijación, las modalidades de mutación más socorridas han sido las inserciones de transposones como Tn5 y las deleciones. Posteriormente, estas mutantes se han complementado con secuencias plasmídicas clonadas en vehículos que se pueden expresar en Rhizobium y E. coli (Revisiónes de Long, en prensa y Kondorosí, en prensa). Esto ha permitido caracterizar y mapear algunos genes de nodulación y de fijación en R. meliloti, R. leguminosarum y R. trifolii.

— Las conclusiones más sobresalientes son que el número de genes involucrados en el proceso de nodulación es relativamente pequeño, que estos genes se encuentran agrupados en diferentes regiones del plásmido cercanas a los genes nif y algunos de ellos se han denominado genes comunes de nodulación ya que pueden complementar mutaciones interespecíficamente en Rhizobium.

Las siguientes evidencias apoyan las conclusiones mencionadas:

En un experimento de mutagénesis al azar para obtener cepas incapaces de nodular (Nod⁻) de R. meliloti, de 6000 colonias mutantes sólo se encontraron cuatro que eran deficientes o anormales en nodulación (Meade et al. 1982). Dos de ellas

no deformaban ni producían enroscamientos en la raíz (mutantes Hac^- ; Hac por hair curling, enroscamiento del pelo), las otras dos producían deformaciones, lisis e hipertrófia de las células de la raíz (Hirsch, 1982). Rolfe en un estudio similar en R. trifolii encontró dos cepas nod^- de 3000 analizadas, pero encontró otras cepas bloqueadas en diferentes pasos de la nodulación. (Rolfe, 1981). Paau et al., 1981, encontró 3 mutantes nod^- entre varios miles de colonias analizadas después de mutagenizar con nitrosoguanidina a R. meliloti. También en R. japonicum, y en R. leguminosarum se han encontrado pocas mutantes nod^- (Maier y Brill, 1976; Beringer, 1977, 1980). En general el número de mutantes nod^- es de 5-10 veces menor que el número de mutantes auxótrofos que se obtienen. La frecuencia de mutantes fix^- sí es similar a la frecuencia de obtención de auxótrofos (Forrai et al., 1983).

Por mutagénesis del plásmido simbiótico también se han obtenido resultados semejantes, de 200 inserciones independientes de Tn5 en el plásmido pRL1J1 de R. leguminosarum (en promedio se tenía una inserción en cada Kilobase de ADN) se obtuvieron tres mutantes deficientes en nodulación, las tres muy cercanas. Cuando estos genes de nodulación se clonaron de la cepa silvestre se encontró que clones de 10 Kb eran capaces de conferir a cepas de R. leguminosarum curadas del plásmido Sim la capacidad de formar nódulos con bacteroides. Indicando que en 10 Kb se encuentra contenida la información para la infección y la diferenciación a bacteroide (Downie et al., 1983a).

En R. meliloti, en R. trifolii y en R. leguminosarum se ha encontrado que los genes nod (Hac) se encuentran a unas 20-30 Kb de los genes nif. (Long et al., 1982; Downie et al., 1983b; Kondorosi et al., 1983; Rolfe et al., 1983; Shine et al., 1982; Huguet et al., 1983).

— La complementación de diferentes mutantes por deleciones en el plásmido Sim con secuencias clonadas en vehículos tipo "cósmido" han permitido identificar otros genes de nodulación y de fijación. En el cuadro 3 se comparan los mapas de R. leguminosarum, R. meliloti y R. trifolii que sitúan los genes nif, fix y nod. Kondorosi (1983) ha mapeado también en esta región los mensajeros de ARN que se expresan en el nódulo (cuadro 3). Se han encontrado otros genes fix que mapean fuera de esta zona en R. meliloti (Boistard, comunicación personal).

Clonas que llevan los genes tempranos de nodulación (Hac) de R. meliloti, R. leguminosarum complementan mutaciones nod de otras especies de R. trifolii, R. meliloti y R. phaseoli (Kondorosi, en prensa; Long, en prensa), estos genes se han designado genes comunes de nodulación.

Por otra parte, se ha buscado si clonas que llevan genes de nodulación tempranos y tardíos y genes fix de una cepa de R. trifolii se encuentran conservados en otras especies de Rhizobium por homología. Se encontró que una clona que lleva los genes Hac está representada en casi todas las cepas de Rhizobium que nodulan trébol, tiene algo de homología con R. meliloti y R. lotus y no hibridiza con otras cepas de crecimiento rápido ni con cepas de crecimiento lento. Una respuesta similar se obtiene con una clona fix que, en general, se encuentra más conservada en cepas cercanas a R. trifolii, con una excepción. Otras clonas tienen un comportamiento opuesto, dos clonas que contienen secuencias involucradas en diferenciación de los bacteroides se encuentran más conservadas en cepas que tienen homología general de ADN aunque nodulen plantas diferentes. Estas secuencias han divergido en cepas que establecen simbiosis con plantas de un mismo grupo de inoculación (Jarvis et al., 1983).

Cabe mencionar el análisis de los genes de nodulación de una cepa de R. leguminosarum con un espectro de infección más amplio que las otras cepas de R. leguminosarum. La cepa TOM - puede nodular además de las variedades comerciales, una línea primitiva de chícharo, el cultivar Afghanistan (Winarno y Lie, 1979). Los resultados muestran que la habilidad para nodular tanto las variedades comerciales como la Afghanistan reside en una pequeña porción del ADN del plásmido Sim pRL5J de la cepa TOM. Tal vez se trate de una variante alélica del gene normal de nodulación, en vez de un gene suplementario que aumente el espectro de infección. En el cuadro 3 se compara este plásmido pRL5J1 de la cepa TOM con un plásmido de una cepa de R. leguminosarum "normal", (Hombrecher et al., 1984).

Recientemente se han obtenido una buena colección de cepas nod⁻ mediante mutagénesis dirigida de las regiones nod (Kondorosi et al., 1983; Long, 1984). El interés actual de los grupos de investigación en simbiosis es la definición de las funciones de estos genes nod y fix. Se sugiere que el gene Hac puede codificar para una cutinasa (Kondorosi, comunicación personal).

Una vez disecados los genes de Rhizobium que participan en el establecimiento de una simbiosis efectiva, se augura que seguirá el entender su funcionamiento y su regulación en diferentes fondos genéticos. Esto permitirá la comprensión de la esencia simbiótica de Rhizobium y dará las herramientas para la construcción de cepas de Rhizobium con diferentes finalidades. También permitirá el análisis de las relaciones evolutivas de los diferentes paquetes simbióticos, quedarían por entender muchos aspectos de la relación planta-bacteria, algunos de los cuales los presentaré más adelante.

LOS MOVILES DEL PROYECTO

La homología estructural de los genes de la nitrogenasa sirvió de punto de partida de la investigación que sobre la fijación de nitrógeno de P. vulgaris (frijol) y R. phaseoli se inició en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. El primer hallazgo fue que, a diferencia con los otros rhizobia estudiados R. leguminosarum, R. trifolii y R. meliloti (Ruvkun y Ausubel, 1980, Prakash, 1981) en R. phaseoli existen reiteraciones de las secuencias de fijación de nitrógeno, con tres copias de los genes de la nitrogenasa reductasa (nifH) (Quinto et al., 1982). La investigación sobre la reiteración del gene nifH ha conducido al estudio de la organización genómica de R. phaseoli. En el camino se han obtenido las siguientes aportaciones al conocimiento de Rhizobium: i) la secuencia nucleotídica de las tres copias del gene nifH de la cepa de R. phaseoli CFN 42 es idéntica y esta identidad se extiende 200 bp hacia la región 5' de los genes (Quinto et al., 1985). ii) cualquiera de los genes nifH es dispensable para la fijación de nitrógeno temprana en nódulos de P. vulgaris, conclusión que se deriva de experimentos de mutagénesis dirigida en los cuales se introdujeron a cada copia de nifH una secuencia interruptora "cassette" que confiere resistencia a Kanamicina (Quinto et al., 1985). iii) además de los genes nifH repetidos existen dos copias del gene nifD (que codifica la subunidad α del componente I de la nitrogenasa y tal vez dos copias del gene nifK (que codifica la subunidad β del mismo componente I) (Quinto, comunicación personal). iv) los genes nifH y nifD funcionan en dos operones, resultado que se deriva de experimentos en los que se generaron dobles mutantes mediante la inserción de "cassettes", que confieren resistencia a espectinomomicina, a la derecha del gene nifH (Segovia, 1985).

En el afán de entender las reiteraciones de los genes nifH

en cuanto a su distribución en R. phaseoli en particular y en Rhizobium en general y en busca de una posible correlación con la especificidad simbiótica se propuso este proyecto con los siguientes objetivos:

1. Establecer si la presencia de múltiples copias de genes de nitrogenasa es un fenómeno general en R. phaseoli. Se planteó un análisis amplio de cepas de diferentes orígenes geográficos y de diferentes tipos de P. vulgaris.
2. Analizar rhizobia aislados de diversas leguminosas en cuanto a la organización de los genes nifH y sus capacidades de nodulación y fijación en P. vulgaris. La selección de cepas de Rhizobium se diseñó tomando en cuenta las relaciones taxonómicas de las leguminosas de las que se aislaron las cepas, con el fin de tratar de establecer correlación entre la organización de los genes nifH y la taxonomía de las leguminosas.
3. Analizar algún sistema simbiótico alternativo al de R. phaseoli que pueda nodular y fijar nitrógeno en frijol. Comparar este paquete simbiótico de alguna cepa de amplio espectro con el de R. phaseoli "específico" para elucidar las relaciones evolutivas de estos plásmidos simbióticos.

En este trabajo presento un análisis sobre diferentes poblaciones de Rhizobium que son capaces de establecer simbiosis con P. vulgaris. Propongo que la reiteración de los genes nifH es un marcador de una de estas poblaciones, la más específica y abundante. Así mismo, considero que las cepas de R. phaseoli sin reiteraciones de los genes nifH pueden ser representantes de cepas del grupo de Rhizobium de amplio espectro de nodulación aislado de leguminosas tropicales.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de cepas.

Aislé cepas de Rhizobium de nódulos de P. vulgaris y de otras especies de leguminosas que colecté en diferentes regiones de Jalisco, Hidalgo, Morelos y Guanajuato. La superficie de los nódulos se esteriliza con cloralex (20% v/v) - durante 3-5 min y el contenido se estría en medio de crecimiento sólido, previo control de contaminación de la superficie.

Medios de cultivo.

Todas las cepas de R. phaseoli crecen en PY (Noel et al 1984) y en MY (Vicent, 1970), algunas cepas de Rhizobium spp sólo crecen en MY. En el apéndice se describen estos medios, como también el medio PA. En este último, Rhizobium crece sin formar muchos polisacáridos lo que facilita la purificación de plásmidos. En el medio BYLA se crecen las cepas para la posterior determinación de cetolactasa.

Ensayos de nodulación.

Las semillas se lavan en etanol al 80% durante 5 min., se enjuagan con agua y se esterilizan durante 15 min. con cloralex al 50%. En algunos casos, como con soya el lavado con etanol se omite, en otros, como en Leucaena, después de este proceso es necesario esclareificar la semilla, lijando la testa en condiciones de esterilidad. Las semillas se germinan en agar al 1% en agua, durante 3 días en la obscuridad. Posteriormente se pasan a frascos (de 50 ó 250 ml) con agar al 0.8% en Faharaeus sin nitrógeno (detalles en el apéndice III). En algunos casos utilicé Jarras Leonard (Vicent, 1970) con vermiculita y solución nutritiva. Las plantas se crecen en la cámara de cultivo de plantas a 28°C con iluminación incandes----

cente y blanca durante 12 hrs. diarias.

Ensayos de reducción de acetileno.

La actividad de nitrogenasa de nódulos se mide como la reducción de acetileno a etileno. El acetileno también es sus--trato de la nitrogenasa. La determinación se puede realizar - entre los catorce y diecisiete días después de la inoculación, dependiendo de la cepa y de la planta. La raíz de las plantas se desprende de la parte aérea y se incuba la raíz con los nódulos unidos a ella en una mezcla de acetileno al 2% durante una hora. En algunos casos medí la actividad de nódulos aislados. Las actividades se reportan en μ molas de etileno produci--das por hora por g de peso seco de nódulo o como porcentajes reducidos del total. Como controles se utilizan las raíces, - desprovistas de nódulos, de los testigos no inoculados.

Visualización de plásmidos.

La lisis de las cepas de Rhizobium se lleva a cabo en los pozos del gel utilizando lisozima, SDS y RNasa de acuerdo a - Eckhardt (1978).

Extracción de ADN.

Se utilizaron dos procedimientos de extracción con resul--tados igualmente buenos. Se describen en el Apéndice.

Hibridización.

El plásmido pCQ152 que contiene 300 pb de la secuencia interna del gene de la nitrogenasa reductasa de R. phaseoli - - CFN42 se utilizó como detector. Se marcó radiactivamente con ³²P siguiendo la técnica de "Nick Traslation" (Rigby, 1977). -

Las hibridizaciones se llevaron a cabo utilizando formamida o fosfatos como se ha descrito. Ver apéndice para los detalles.

Purificación de plásmidos.

El plásmido simbiótico de la CIAT 899 se purificó del Agrobacterium al cual se había transferido, el plásmido simbiótico de la CFN 249. (de Dalea) se purificó directamente de esta cepa. Se siguió el método de extracción alcalina de - - Hirsch (1980).

Clonación de secuencias de plásmidos.

Se clonó el pDal, el plásmido simbiótico de la CFN 249 en el vehículo pRK 404. Ver apéndice.

Reiteration of Nitrogen Fixation Gene Sequences and Specificity
of Rhizobium in Nodulation and Nitrogen Fixation in Phaseolus
vulgaris

Esperanza Martínez*, Marco A. Pardo, Rafael Palacios and
Miguel Angel Cevallos.

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apdo. Postal 565-A. Cuernavaca, Morelos. México.

Shortened running title:

nif Reiteration and Symbiotic Specificity.

Subject category:

Genetics and Molecular Biology

SUMMARY

We have previously reported that R. phaseoli has multiple copies of nitrogen fixation gene sequences. In this work we extend our analysis to cover a broader scope of R. phaseoli strains and other rhizobia isolated from different legumes. Our results indicate that most R. phaseoli strains have reiterated nifH sequences. Reiterations are also found in rhizobia from nodules of other Phaseolus species and from the close relative Pachyrhizus. However nifH gene reiteration is not always found in the rhizobia able to nodulate and fix nitrogen in Phaseolus, since some strains isolated from nodules of Phaseolus vulgaris as well as from other legumes are able to establish an effective symbiosis with bean and do not show reiterations. We propose that there are different evolutionary lines of R. phaseoli. The reiteration of nif genes may be considered a marker for the most abundant and specialized of these evolutionary lines.

INTRODUCTION

Bacteria of the genus Rhizobium induce nodules and fix nitrogen in the roots of legumes. Rhizobium species have been defined according to the host they infect. This classification gathers into a group different bacteria that may share only a certain nodulation ability. R. phaseoli, the symbiont of Phaseolus vulgaris, common bean, has been catalogued as a very heterogeneous group (Beynon & Josey, 1980; Roberts et al., 1980; Catteau et al., 1984). We have described a peculiar organization of nitrogen fixation genes in R. phaseoli characterized by the presence of stable reiterations (Quinto et al., 1982). In R. phaseoli strain CFN-42, there are three different regions in its symbiotic plasmid that contain identical and complete nitrogenase reductase coding sequences (nifH). Site directed mutagenesis indicated that none of the three nifH gene copies is indispensable for nitrogen fixation during symbiosis with Phaseolus vulgaris (Quinto et al., 1985). To establish how general nifH gene reiterations are in R. phaseoli, we extended our studies to strains isolated from diverse types of Phaseolus vulgaris and from other Phaseolus species. We analyzed strains from different geographical origins with an emphasis on strains from Mesoamerica because Phaseolus vulgaris had its origin and was diversified in this region (Miranda, 1967; Gentry, 1969).

Reiterations of nif genes have been reported in bacteria other

than rhizobia (Rice et al., 1982; Kallas et al., 1983; Scolnick & Haselkorn, 1984). To understand further nif gene reiterations, and because of a possible correlation between the evolutionary trends of plant and Rhizobium, fast growing rhizobia were isolated from various legumes, the latter chosen because of their taxonomic relationships. In this paper we describe symbiotic properties of these strains and analyze their nifH gene organization patterns.

METHODS

Bacterial Strains. R. phaseoli strains were isolated from bean nodules obtained from important, native, agricultural areas of Mexico: Jalisco, Hidalgo, Morelos and Guanajuato. R. phaseoli strains are listed in Table 1. Rhizobium strains from other legumes are listed in Table 2. To test for Agrobacterium contamination, all Rhizobium isolates were assayed for 3-ketolactose production (Bernaerts & De Ley, 1963) using Benedict's reagent and cultures grown in BYLA medium. BYLA contained, per litre, 10g lactose, 0.5g K_2HPO_4 , 0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g $CaCl_2$, 50mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 3g yeast extract, 15g agar. None of the Rhizobium strains gave a positive reaction.

Isolation of Rhizobium strains. Bacteria were isolated from active, nitrogen-fixing nodules from legumes that grew in the field or were grown from seeds in the laboratory in soils, and under conditions, that resembled their natural habitats. Nodules were surface sterilized and tested for surface contamination. Nodule isolates were grown in peptone yeast medium, PY (Noel et al., 1984). Strains from Centrosema and Vigna, that do not grow well in PY, were grown in yeast mannitol medium, YM (Vincent, 1970) that contained 1g of yeast extract per litre. Isolated colonies were serially diluted in 10 mM MgSO₄, 0.0 1% (v/v) Tween 40 (Kuykendall & Elkan, 1976) and plated for further colony purification.

Nodulation Assays. Seeds of different legumes were surface sterilized (Wacek & Brill, 1976). Depending on the plant size, different flasks were used that contained nitrogen-free plant nutrient (Wacek & Brill, 1976) and 0.8% (v/v) agar. Inoculation was as described (Noel et al., 1984). Sometimes modified Leonard "bottle jars" (Vincent, 1970) with vermiculite were used. All controls were devoid of nodules.

Acetylene Reduction Assays. Nitrogenase activity was measured by acetylene reduction (Wacek & Brill, 1976). Whole root systems were incubated for 1 hour in sealed 25 ml vials containing 2% (v/v) acetylene. Samples were injected in a

Packard 430 gas chromatograph with a Poropak N, 80-100 column.

DNA Hybridization. DNA was obtained from the different Rhizobium strains and digested with BamH1 restriction endonuclease. Total DNA digests were subjected to electrophoresis in 1% agarose gels and then transferred to nitrocellulose filters (Southern, 1975). Hybridization was performed under low stringency conditions, as reported previously (Quinto et al., 1982). A recombinant plasmid (pCQ152) carrying a 300 bp sequence from the coding region of the nifH gene from R. phaseoli CFN-42 was used as probe; this fragment codes for aminoacids 28 to 119 of nitrogenase reductase (Quinto et al., 1985).

RESULTS

Most R. phaseoli strains have nifH gene reiterations.

DNA obtained from the strains isolated from bean nodules was digested with BamH1. Total genomic digests were subjected to agarose gel electrophoresis, blotted and hybridized with a nifH specific probe from R. phaseoli CFN-42 (Quinto et al., 1985). The strains tested included bacteria from both bush P. vulgaris and climbing cultivars (the latter are considered to be better nitrogen fixers

(Graham, 1981)), and from Phaseolus vulgaris wild-type. Figure 1 shows the hybridization patterns of these strains. Pattern 1 was the most common. It has three bands of 9.8, 5.6 and 4.0 kb. We have also observed other, triple-band patterns (Fig. 1-patterns II, III and IV) that have differences in the sizes of the bands. Pattern V shows only two bands.

In a first survey, we found that out of 40 strains of R. phaseoli tested, only one did not show reiteration of nifH. Since this strain, CIAT 899, is aluminium and acid tolerant, we investigated whether this type of R. phaseoli was common in acid soils. We analyzed other acid tolerant strains; one of them showed reiterations (CIAT 896), the others (UMR1020 and UMR1026) did not. UMR1020, UMR1026 and CIAT 899 each have the same size BamHI-generated nifH hybridization band.

nifH gene reiterations are found in bacteria isolated from other species of Phaseolus and from the close relative Pachyrhizus. Figure 2 shows the taxonomic relationships of the legumes (Heywood, 1971) from which we isolated fast growing strains of Rhizobium (Table 2). Emphasis was given to the isolation of bacterial strains from plants taxonomically related to Phaseolus vulgaris (Marechal et al., 1978). Strains from Phaseolus coccineus, Phaseolus acutifolius

and from Pachyrhizus nodules showed reiterated nifH sequences and were able to nodulate and fix nitrogen in Phaseolus vulgaris (Fig. 2). The patterns of reiteration fall within the patterns obtained for R. phaseoli strains (Table 1). No reiterations were found among Rhizobium strains from other legumes including some Phaseolus relatives such as Vigna and Macroptilium

The capacity to nodulate P. vulgaris effectively is widespread among rhizobia. Various strains from different legumes are able to nodulate and fix nitrogen in P. vulgaris; this capacity does not correlate with the phylogeny of the legumes from which the bacteria were isolated (Figure 2). Strains isolated from the subfamily Mimosoideae, from the species Leucaena and Acacia were able to nodulate P. vulgaris. Furthermore strains from Leucaena leucocephala, and from L. esculenta were able to fix nitrogen in bean. In contrast, strains from Vigna, which belongs to the same subtribe as Phaseolus, form only small ineffective nodules from which bacteria could not be recovered.

Nonspecific strains that are able to fix nitrogen in bean do not have reiterated nif sequences. Strains isolated from Macroptilium gibbosifolium, from Crotalaria pumila, from Dalea leporina and from the species of Leucaena mentioned

above established effective nodules in Phaseolus vulgaris, did not show reiterated sequences when probed with a R. phaseoli internal nifH fragment, and displayed different hybridization patterns that distinguished them from each other (Fig. 3). When reisolated from bean nodules, the strains proved to be the same as the inoculum by the following criteria: the nif hybridization pattern (fig. 3), the total DNA digestion pattern and the ability to nodulate the original host legume (data now shown). The nitrogen fixing activities of these strains in P. vulgaris, measured by the acetylene reduction assay, were in some cases similar to the R. phaseoli strains (data not shown).

The "non-reiterated" R. phaseoli has a broad infection spectrum. We tested the symbiotic properties of different Rhizobium strains using Leucaena leucocephala as a host. Leucaena leucocephala has been described as specific for its Rhizobium requirements (Norris, 1967; Trinick, 1968). "Non reiterated" R. phaseoli strains, CIAT 899, UMR1020 and UMR1026 nodulate Leucaena, although not effectively. None of the "nif reiterated" R. phaseoli strains tested (CFN1, CFN5, CFN23, CFN25, CFN42) nodulated Leucaena. The non-specific Rhizobium strains that nodulated and fixed nitrogen in bean (strains from Dalea leporina, from Crotalaria pumila and from Macroptilium gibbosifolium) nodulated L. leucocephala effectively. So they may be considered broad host range strains. It should be noted that these strains showed single

nifH hybridization bands.

Under natural conditions bean may be nodulated by strains that nodulate other legumes. To test whether Rhizobium from other legumes could nodulate P. vulgaris under natural conditions, we grew beans in soils where wild or cultivated Leucaena trees grew. We isolated 12 strains from these bean nodules. About half of these strains were able to nodulate Leucaena leucocephala effectively and did not have reiterations of nifH (Fig. 4); the other isolates only nodulated bean and had the reiterated pattern of R. phaseoli (Fig. 4).

DISCUSSION

R. phaseoli has been defined as the Rhizobium that forms nitrogen fixing nodules in bean. It comprises a very heterogeneous group on the basis of protein patterns, (Roberts et al., 1980), plasmid profiles (Martínez & Palacios, 1984), antibiotic resistance (Beynon & Josey, 1980) and numeric taxonomy (Catteau et al., 1984). Our data indicate that it is a more homogeneous group on the basis of nif gene reiterations. In R. phaseoli strain CFN-42, the three copies of nifH are part of a large 270 Md plasmid (Quinto et al., 1982) that also carries other symbiotic determinants (unpublished). Thus the reiterated nif genes are linked to the symbiotic information for bean nodulation as part of a plasmid that

could be contained in different bacterial backgrounds. We have observed that randomly selected cloned fragments from the R. phaseoli CFN-42 symbiotic plasmid show a higher degree of conservation than cloned chromosomal fragments from the same strain when hybridized to total genome digests from other R. phaseoli strains (our unpublished results).

Our screening of fast growing rhizobia from different legumes of the subfamilies Papilionoideae and Mimosoideae was not intended to be comprehensive. R. leguminosarum and R. trifolii were not included as their nifH gene organizations have already been established (Ruvkun & Ausubel, 1980). Our results suggest that reiterations of the nifH gene are restricted to rhizobia isolated from some genera of the Phaseolineae tribe. Data from other groups support this proposal. Strain ANU240, a streptomycin resistant derivative of NGR 234, has two nifH copies (Morrison et al., 1983). This broad host range strain (Broughton et al., 1984) was originally isolated from Lab-lab purpureus which belong to the Phaseolineae tribe. NGR 234 does not nodulate bean (Trinick, 1980). Recently, reiterations of nif genes have been reported in fast growing R. japonicum (Prakash & Atherly, 1984); Glycine max, its host, belongs also to the Phaseolineae tribe. We have tested these R. japonicum strains for nodulation in P. vulgaris, we have found that they form small ineffective nodules. Nodulation of Phaseolus vulgaris by a wide range of strains

from tropical legumes was reported several years ago (Lange, 1961), but there were not data on the nitrogen fixation activity. Our results show that Phaseolus vulgaris may be nodulated effectively by non-specific Rhizobium from tropical legumes. These strains do not show nif reiterations. We propose that those strains isolated primarily as R. phaseoli and that do not have nif reiterations may be representatives of fast growing rhizobia from tropical legumes that are capable of nodulating bean. Indeed, we have found Leucaena Rhizobium strains forming nodules on bean roots in soils where Leucaena trees grow.

Rhizobium strains from Dalea leporina, Crotalaria pumila and from Macroptilium gibbosifolium, besides nodulating their original host, also nodulate Phaseolus and Leucaena effectively. R. phaseoli strains: CIAT 899, UMR1020 and UMR1026 also nodulate Leucaena. In contrast, R. phaseoli "reiterated" strains are more specific. They nodulate effectively only P. vulgaris (cultivar and wild-type) and P. coccineus (data not shown; Graham & Halliday, 1977). If the primitive Rhizobium had a broad host range and evolved to become more specific for certain legumes, then the nifH gene reiterations may be considered a marker of this specialization in one of the evolutionary trends of R. phaseoli.

RESULTADOS

En el artículo "Reiteration of Nitrogen Fixation Gene - Sequences and Specificity of Rhizobium in Nodulation and - Nitrogen Fixation in Phaseolus vulgaris (Journal of General Microbiology, en prensa) se presentan los siguientes resultados:

La mayoría de las cepas de R. phaseoli poseen un patrón común de organización de genes de la nitrogenasa reductasa (nifH) caracterizado por tener tres copias de ésta. (Fig. 1 y tabla 1).

Cepas aisladas de otras especies de Phaseolus, de Phaseolus coccineus y de Phaseolus acutifolius y de la especie cercana Phachyrhizus erosus también tienen múltiples copias de genes nifH. Todas estas cepas son capaces de nodular y fijar nitrógeno en P. vulgaris. (Tabla 1 y Fig. 2).

Algunas cepas de Rhizobium aisladas de leguminosas no relacionadas cercanamente a frijol pueden establecer una simbiosis efectiva con éste y no tienen genes nifH reiterados (Fig. 2). Estas cepas poseen un espectro de nodulación más amplio, nodulan efectivamente Leucaena leucocephala (aunque no nodulan ni chícharo, ni trébol, ni alfalfa).

El tipo de cepas de Rhizobium, de espectro más amplio, sin reiteración de genes nifH, pueden formar hasta el 50% de los nódulos de frijol, si se crece el frijol en suelo donde estas bacterias se encuentran muy enriquecidas. v.g. en suelos donde crecen árboles de Leucaena spp (Fig. 4).

In Addendum.

Sobre el espectro de nodulación de las cepas de R. Phaseoli.

Las cepas CIAT 899, UMR 1020 y UMR 1026 (R. phaseoli con copia única de genes nifH), pueden nodular y fijar nitrógeno (medido como reducción del acetileno, Tabla 4) en la especie Leucaena esculenta, esto las diferencia de las otras cepas de R. phaseoli (CFN1, CFN 5, CFN 23, CFN 42, Nitragin - 8251 y 8184) que no nodulan Leucaena ni tampoco, Albizzia sonorensis, Acacia albida, Canavalia spp, Canavalia encifornis, Desmodium heterophyllum, Vigna unguiculata, Vigna decipiens, Vigna vexillata, Vigna hosei, Pueraria phaseoloides.

Los ensayos de nodulación utilizando Leucaena como macro-simbionte tienen como ventajas el tamaño pequeño de la semilla y de la planta, (Fig. 5). Debido a que las reservas en el cotiledón son menores que en frijol, las diferencias en desarrollo son más obvias entre las plantas noduladas efectivamente y las no noduladas. En la Fig. 6 muestro una planta de Leucaena esculenta nodulada por la cepa de R. phaseoli UMR 1020 y un control no nodulado. En la Fig. 7 presento los nódulos formados en Leucaena esculenta por UMR 1020 y en la Fig 8 por la cepa CIAT 899.

Tomando en cuenta los espectros de nodulación, me permito proponer que las cepas de R. phaseoli con reiteraciones de nifH son específicas y que las de copia única pueden considerarse como "no específicas" o de amplio espectro.

Sobre otras características de las cepas R. phaseoli.

La cepa CIAT 899 crecen en medio Luria (LB) (medio en el que normalmente crece E. coli, Agrobacterium, etc), no así - otras cepas de R. phaseoli (CFN 42 por ejemplo). En LB también crecen algunas cepas de Rhizobium de otras leguminosas, por ejemplo la CFN 243 y 249 aisladas de Dalea leporina.

La capacidad de la CIAT 899 de crecer en LB no la comparte con las cepas de R. phaseoli UMR 1020 y 1026 que tienen el mismo patrón de genes nifH, tampoco la comparte con las cepas CIAT 894 y 896 que al igual que la CIAT 899 son ácido y aluminio resistentes (ver discusión más adelante).

Encontré que las cepas UMR 1020 y 1026, los otros dos aislamientos de R. phaseoli que tienen una única copia de nifH son idénticas por varios criterios: ninguna de las dos crece en LB, la banda de hibridación con genes nifH en ambas cepas es de idéntico tamaño, idéntico también al de la CIAT 899 (Fig. 9a), presentan un mismo perfil del plásmido (Fig. 9b), y un mismo perfil de genoma total digerido con BamH1 (Fig. 9c).

Sobre la adecuación de las cepas de Rhizobium spp para nodular P. vulgaris.

Algunas cepas de Rhizobium aisladas de leguminosas no relacionadas cercanamente a frijol (a las que me referiré colectivamente como Rhizobium spp) pueden formar una simbiosis efectiva con éste (ver figura 2). Sin embargo el número de nódulos, que se forman, así como el peso total de nódulos varía entre el 20-50% de lo que se obtiene con una cepa de R. phaseoli, v.g. CFN 42, que es nuestra cepa de referencia (tabla 3). No obstante, la actividad específica de fijación de nitrógeno, en algunos casos, es semejante a la de la CFN 42 (tabla 3a).

Otro indicador de la simbiosis es el tiempo de formación de los nódulos maduros, activos en fijación de nitrógeno. Las cepas de Rhizobium spp. tienen un retraso en la nodulación de aproximadamente 3 días con respecto a la cepa CFN 42, el pico máximo de fijación de nitrógeno también se alcanza con este retraso.

En el peso y el aspecto de las plantas también se refleja esta falta de capacidad simbiótica de los rhizobia no específicos aislados de Dalea y de Crotalaria. Esto se observa en ensayos de nodulación en jarras Leonard (tabla 3b).

Sobre la plasticidad de las cepas de Rhizobium spp

Cepas de Rhizobium aisladas de Dalea leporina, de Crotalaria mollicula, y de Leucaena esculenta forman en frijol nódulos heterogéneos, la mayoría inefectivos entre los que se destacan un cierto número de nódulos bien desarrollados y rojos. Seleccioné los nódulos más grandes con hemoglobina, probé que eran activos en fijación de nitrógeno y aislé de estos nódulos las cepas de Rhizobium. La identidad de estos aislamientos con los inóculos originales en cada caso, la comprobé por diferentes criterios: conservación del patrón total de ADN digerido con la enzima de restricción BamHI, conservación del patrón de organización de los genes nifH (Fig. 3), o por los marcadores de resistencia a antibióticos y la nodulación a la planta original ó a Leucaena spp.

Se probó nuevamente la capacidad simbiótica en frijol de estos rhizobia así seleccionados, y se encontró que a diferencia con la cepa original, la mayoría de los nódulos eran rojos y desarrollados y además la fijación de nitrógeno por planta se incrementó de dos a tres veces en comparación con las cepas originales respectivas (Tabla 3a). Para algunas de estas cepas se tienen las evaluaciones de los pesos de las plantas de frijol (tabla 3b), que se incrementan al aumentar la fijación de nitrógeno. Los cambios genéticos involucrados en la generación de cepas con mayor capacidad para fijar nitrógeno en frijol se han estudiado en la cepa CFN 249 (aislamiento original de Dalea leporina. La capacidad para fijar nitrógeno se puede transferir de la cepa derivada a la cepa original mediante la movilización del plásmido simbiótico de la cepa 249. Esta línea del proyecto la ha acogido Marco Aurelio Pardo G., cuya Tesis de Licenciatura y de Maestría actualmen-

En breve, los avances han sido: purificamos el plásmido simbiótico de esta cepa, en el cual reside el cambio genético que tiene como consecuencia una mayor fijación de nitrógeno. Cloné este plásmido en el vehículo pRK404 (apéndice) que tiene la bondad de expresarse en Rhizobium. Hemos encontrado que una de estas clonas revela diferencias estructurales entre la cepa original (CFN 249) y la derivada {325} mejor fijadora de nitrógeno. (M.A. Pardo. Tesis de Licenciatura IBB).

Sobre la comparación estructural y funcional de algunos plásmidos simbióticos.

La información genética para establecer nódulos efectivos en P. vulgaris puede estar contenida en plásmidos de diferente tamaño. En la Fig. 10 muestro un diagrama en el que se comparan los tamaños de tres diferentes plásmidos simbióticos de las cepas CIAT 899, CFN 42 y CFN 249 (de Dalea). Los demás plásmidos que tienen las cepas CIAT 899 y CFN 42 no los muestro. En la cepa CFN 249 sólo se observa una sola banda que corresponde al plásmido simbiótico ilustrado.

Para establecer el grado de homología entre los diferentes plásmidos se purificó el plásmido de la CFN 249 y se digirió con la enzima de restricción BamHI (Fig. 11, carril a).- Este perfil se hibridizó con el plásmido de la cepa 899 radiactivo (Fig. 11, carril b). Se observan aproximadamente siete bandas de hibridización, la menor de las dos bandas más intensas contiene al gene nifH. Por otra parte, el plásmido de la CFN 249 se utilizó como detector radiactivo y se hibridizó contra un patrón genómico total de la CFN 42 y de la CIAT 899. En la Fig. 12 se muestra esta homología, que se restringe a ciertas regiones del plásmido,

Por su parte, M.A Cevallos comparó la homología entre la cepa CFN 42 y la CIAT 899. Digestiones de todo el genoma de la CFN 42 las hibridizó contra el plásmido marcado de la CIAT 899, encontrando un número limitado de bandas homólogas.

M. Megías encontró que el plásmido Sim de la cepa R. phaseoli CIAT 899, al ser transferido a Agrobacterium, le confiere a éste la capacidad para nodular y fijar N en frijol. La cepa UMR 1020 ó 1026 es la única otra cepa de R. phaseoli que no presenta reiteraciones, se distingue de la CIAT 899 por su patrón total de digestión genómica, por su perfil de plásmidos, por los tamaños diferentes de los plásmidos simbióticos (el plásmido simbiótico de la cepa UMR1026 es aproximadamente 2 veces mayor que el de la CIAT 899, Fig. 10) y por su incapacidad para crecer en LB, sin embargo, la organización de genes nifH es idéntica en ambas cepas. Para contestar si el plásmido simbiótico de la UMR 1026 también contiene la información necesaria para hacer a Agrobacterium nodular y fijar nitrógeno en P. vulgaris, se movilizó este plásmido a una cepa de Agrobacterium tumefaciens curada del plásmido críptico y del Ti (GMI 9023). Ver apéndice I. Encontré que este Agrobacterium conteniendo al plásmido simbiótico (pU1) de la cepa UMR 1026 es capaz de nodular y fijar nitrógeno en P. vulgaris.

Sobre algunas características simbióticas de nuevas adquisiciones de Rhizobium.

Se han aislado cepas de Phaseolus lunatus, de Clitoria ternatea y más cepas de Phaseolus vulgaris silvestre y de Pachyrhizus erosus. Se consiguieron cepas de Rhizobium japonicum de crecimiento rápido y una cepa de Sesbania. En la tabla 5 se muestran las propiedades simbióticas de estas cepas, de todas estas cepas, salvo las de R. japonicum, se aisló el ADN para probar su patrón de hibridización con los genes nifH.

Prakash y Atherly (1984) reportaron que las cepas USDA 195 y 205 de R. japonicum de crecimiento rápido tienen dos copias de genes nifH. Glycine max y Glycine soja son especies de la subtribu Glycinae al igual que Phaseolus.

DISCUSION

En un primer escrutinio de *R. phaseoli* sobre su organización de genes nifH, se encontró una sola cepa (CIAT 899) que no poseía el patrón observado de múltiples copias nifH. Esta cepa, al igual que las cepas CIAT 894-898, todas aisladas de Carmen del Viboral en Colombia por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) son ácido resistentes y tolerantes a aluminio. Graham (1980) analizó 52 cepas diferentes de *R. phaseoli* y encontró que aparte de las cepas mencionadas - (CIAT 893-899) sólo otras tres eran resistentes a pH ácido de 4.6 y a 4 ppm de aluminio. Los efectos de la acidez, se observan tanto en la inhibición o disminución del crecimiento de la bacteria como en la inhibición del proceso de nodulación - (Keyser et al., 1979; Munns y Keyser, 1981; Graham, 1981). En suelos ácidos (pH menor a 5.5), la concentración de Rhizobium es muy baja (Graham y Hubbell, 1975). Los suelos ácidos son característicos de la selva tropical. En México, en general, los suelos son neutros o alcalinos exceptuando los suelos de la selva de Chiapas y otras regiones selváticas (Dr. Turrent, comunicación personal). Grandes áreas de América del Sur, - entre las que se incluyen los Llanos Orientales de Colombia y Venezuela y los Cerrados de Brasil, tienen suelos extremadamente ácidos (Graham y Hubbell, 1975).

Con base en lo anterior, se pensó que las condiciones de acidez mencionadas ejercían una presión para seleccionar un tipo de bacterias capaces de nodular frijol distintas de las cepas de *R. phaseoli* típicas. Las cepas atípicas las podríamos reconocer por su copia única de genes nifH. Se consiguieron otras cepas ácido resistentes de Brasil y de Colombia. Contrario a lo que esperábamos, la cepa CIAT 896, oriunda del mismo sitio que la CIAT 899, presentaba genes nifH reiterados y no crecía en LB. (El LB tiene 171.2 mM de NaCl, lo que inhibe el crecimiento de muchas cepas de Rhizobium). Sin embargo, otras cepas (UMR 1020 y 1026) ácido resistentes de Brasil, sí resultaron como la cepa CIAT 899 en el patrón de hi-

bridización con los genes nifH. En la sección de resultados presenté los datos sobre la identidad de las cepas UMR 1020 y 1026, así mismo presenté las características que la distinguen de la CIAT 899.

Estos datos muestran que en R. phaseoli resistentes a -- acidez se encuentran con mayor frecuencia cepas sin reiteraciones de genes nifH y apoyan la hipótesis que correlaciona estos hechos. También se puede interpretar que, dado que en -- suelos ácidos la concentración de R. phaseoli es baja (Morales et al., 1973), otras cepas con potencialidad para nodular frijol, pero con menor capacidad competitiva frente a las cepas de R. phaseoli, al no enfrentarse al Rhizobium específico pueden ganar acceso a los nódulos de P. vulgaris.

He encontrado que algunos rhizobia aislados de otras leguminosas distintas de Phaseolus, pueden formar simbiosis efectivas con P. vulgaris con un grado de adecuación tal que pudiera predecir que son menos competitivos que el Rhizobium -- específico. A partir de estos resultados y considerando el -- espectro de nodulación de los citados rhizobia spp y de los R. phaseoli con copia única de nifH, me inclino a pensar que las cepas CIAT 899, UMR 1020 y 1026 son representantes del Rhizobium de amplio espectro, simbionte de leguminosas tropicales.

En este trabajo muestro que rhizobia aislados de tres de las cuatro especies domesticadas de Phaseolus y de Pachyrhizus erosus (jícama) presentan reiteraciones de los genes -- nifH, así también cepas de P. vulgaris silvestre (existe controversia sobre la identidad de P. vulgaris silvestre, D. Piñero, comunicación personal). Se han reportado múltiples copias de nifH también en cepas de R. japonicum de crecimiento rápido. La soya pertenece a la misma tribu que el frijol y -- existen similitudes en cuanto a la morfología, estructura y -- funcionalidad de los nódulos de ambas especies.

Sabemos que existen en los plásmidos de R. phaseoli otras secuencias repetidas además de nifH (nif D y K, Carmen Quinto; clona 10, 20, 21 y 27 Margarita Flores, comunicaciones personales). Además existe la posibilidad de que algunas de estas secuencias reiteradas se pierdan o se generen (G. Sobrón, comunicación personal). Esto sugiere que en Rhizobium existen mecanismos de plasticidad genómica que tienen como consecuencia la amplificación de algunas secuencias o su desaparición y que algunas reiteraciones se pueden fijar en el genoma como es el caso de nifH en los microsimbiontes de la tribu Phaseolineae (en soya, frijol y Lab-lab).

La ventaja de posser múltiples copias de nifH o de secuencias aledañas, no la hemos podido definir. La inactivación irreversible de alguna de las tres copias de nifH en R. phaseoli CFN 42 no resulta en detrimento de la fijación de nitrógeno en nódulos jóvenes de P. vulgaris. La cinética de fijación de nitrógeno, es como se muestra en la figura 13 (Graham, 1981). A tiempos tempranos, la reserva de N del cotiledón suple en gran parte las necesidades de nitrógeno de la planta. En el momento de llenado de la vaina y de la semilla, las necesidades de N se vuelven más apremiantes, en este período no se ha evaluado la capacidad de fijación de las cepas mutantes mencionadas.

Aunada a la reiteración de nifH en R. phaseoli, se encuentra un paquete genético ad hoc para nodular P. vulgaris con tal adecuación que, salvo condiciones extremas, excluyen a otras cepas de Rhizobium spp con la potencialidad de nodular y fijar N en frijol. La existencia de cepas de Rhizobium spp en campos donde se cultiva frijol, la puedo atestiguar por los aislamientos de las cepas CFN 241, 249 y 244 de plantas de Crotalaria, de Dalea y de Macroptilium que crecían entre los cultivos de frijol (de ahí mismo, de los Altos de Jalisco, proceden las cepas de R. phaseoli CFN 277 y CFN 280, ambas con reiteración de nifH, patrón I);

Otros patrones de organización de genes nif se han encontrado en Rhizobium con otras especificidades. En tres cepas diferentes de R. meliloti sólo se encuentran pequeñas diferencias entre los mapas de restricción de las regiones nif (revisión de Kondorosi, en prensa). Los genes nifHDK de R. meliloti (Kondorosi, en prensa), de R. trifolii (Scott et al., 1983) y de R. leguminosarum (Downie et al., 1983) se encuentran contiguos en los plásmidos simbióticos. En los rhizobia de crecimiento lento, R. japonicum (Kaluza et al., 1983) y Rhizobium "cowpea" (Yun y Szalay, 1984) nifHDK se encuentra en el cromosoma, los genes KD están separados del gene H por 16 y 20 Kb respectivamente. En un Rhizobium de Parasponia de crecimiento lento también los genes H y D se encuentran separados 13Kb entre sí y están en diferentes operones (Scott, 1983). Resultará muy interesante la comparación de la organización genética y de la secuencia de los genes nifH de las cepas de crecimiento rápido de R. japonicum con las de R. phaseoli. Ya que ambos rhizobia tienen reiteración de nifH, esta comparación permitirá distinguir si la reiteración de nifH es un caso de evolución convergente, que surgió independientemente en las dos "especies" o si tienen un origen común.

El utilizar Leucaena como macrosimbionte es interesante ya que es oriunda al igual que el frijol de Mesoamérica, en donde se ha diversificado y de donde se ha exportado a Australia, a Filipinas y a Hawai. En este último sitio se ha realizado un importante trabajo de mejoramiento de Leucaena leucocephala seleccionando variedades de rápido crecimiento como la variedad Salvador que crece 10 m en dos años (Brewbaker, 1975)

Leucaena leucocephala, es autógama mientras que Leucaena esculenta es de polinización cruzada, pertenece a la subfamilia Mimosoideae, a diferencia del frijol que pertenecen a la subfamilia Papilionoideae, por lo que se pueden considerar

como no relacionados cercanamente en la filogenia de las leguminosas. El encontrar que cepas de Leucaena y de otras plantas no relacionadas filogenéticamente con P. vulgaris pero que comparten con éste el sitio de diversificación, pueden nodular efectivamente frijol, sugiere una correlación ecogeográfica más que una correlación entre la taxonomía de las leguminosas y las características de Rhizobium. Esta conclusión - también se ve apoyada por los datos que muestran de la nodulación incipiente de cepas de R. japonicum (de crecimiento rápido) o de Vigna vexillata. Vigna y soya son parientes cercanos de P. vulgaris pero se diversificaron en Asia. Otras evidencias también apuntan que las asociaciones simbióticas evolucionaron entre poblaciones de leguminosas geográficamente limitadas y las bacterias locales del suelo (Lie, 1978).

Además de la penetración a través de los hilos de infección formados en los pelos radiculares existen modos alternativos mediante los cuales Rhizobium invade a la raíz. En los nódulos de Crotalaria vespertilio y de Leucaena leucocephala así como en otras dos docenas de especies de leguminosas no se han encontrado hilos de infección (Dart, 1977; Bauer, - - 1981). En las especies de Crotalaria y de Leucaena mencionadas además no se encuentran dentro del nódulo células no infectadas como cuando el Rhizobium se distribuye por hilos de infección (Dart, 1977).

Los hilos de infección también pueden iniciarse en las células epidérmicas (ver ilustración de un corte de raíz, Fig. 13) que no forman pelos radiculares. Este es un "camino menor" de infección en soya y se propone como un modo adicional de infección en Phaseolus lunatus. En P. lunatus la existencia de dos vías de infección, a través de pelos radiculares y por invasión directa de células epidérmicas, tal vez expliquen la nodulación profusa: 100-200 nódulos por raíz (Bal y Wong, 1982). En P. vulgaris también se forman un gran número de nódulos en las raíces. Existen trabajos en los que se reporta la existen

cia en frijol de hilos de infección, Laurent en 1891, observó hilos de infección en los nódulos de frijol y McCoy en 1929 los observó en pelos radiculares. No se ha descrito otro modo alternativo de infección en frijol, sin embargo, algunos resultados de este trabajo y otros datos independientes me inclinan a proponer que en frijol existe una vía alterna de penetración de Rhizobium a la raíz. Es por esta vía, sin hilos de infección en pelos radiculares, que podrían penetrar rhizobia no específicos aislados de Dalea, Leucaena y Crotalaria (los simbiotes de estas dos últimas normalmente penetran a ellas sin hilos de infección, sobre Dalea no hay información). Este modo de infección (más laxo) pudiera explicar la habilidad de P. vulgaris de formar nódulos con un amplio rango de cepas de Rhizobium.

En Arachys hypogea (cacahuate), las bacterias de Rhizobium (crecimiento lento) penetran intercelularmente aprovechando la coyuntura de la separación de células cuando emergen las raíces laterales. Arachys hypogea es bastante promiscua y puede ser nodulada por cepas de R. japonicum, R. phaseoli, R. lupini y ocasionalmente R. meliloti. Se sugiere que la capacidad del cacahuate de ser nodulada por diferentes bacterias es debida a esta forma de infección (Dart, 1977). Un modo similar pero no idéntico de infección y de inicio de la nodulación se ha observado recientemente en Stylosanthes (Bauer, 1981). Algunas especies de Stylosanthes se han descrito como promiscuas efectivas (Date y Halliday, 1975). La forma de infección de Arachys parece tener similitud con el desarrollo temprano de los tumores formados por Agrobacterium, el cual entra a la planta a través de heridas y permanece intercelularmente. Los nódulos en Arachys se pueden reconocer como tales antes de que el Rhizobium se encuentre dentro de las células. Durante las divisiones celulares rápidas en cacahuate, inducidas por Rhizobium, la pared se vuelve tan delgada en algunos sitios, de tal manera que la bacteria puede entrar al citoplasma

ma de la planta (Dart, 1977). Si la vía alterna de infección en P. vulgaris se asemejará a la Arachys explicaría la capacidad de los Agrobacteria con los plásmidos sim de R. phaseoli CIAT 899 (M. Megías) y UMR 1026 (este trabajo) de nodular y fijar nitrógeno en frijol. Las características de la simbiosis en frijol de estos Agrobacteria son semejantes a las de las cepas de Rhizobium spp. En ambos casos el número de nódulos es más bajo y la nodulación es tardía, lo que pudiera sugerir que la penetración es por una vía alterna no especializada, que tal vez pudiera ser una reliquia evolutiva en frijol de la vía primitiva de infección. Las cepas de R. phaseoli específicas (las nifH reiteradas) entrarían por la vía especializada, que tal vez será la de los hilos de infección en pelos radiculares. Si toda esta especulación fuera cierta, la concepción y el giro de algunos proyectos de investigación del Centro, cambiarían, por esto propongo como prioritario el elucidar las vías de infección en P. vulgaris microscópicamente y tal vez también genéticamente. En la línea de chícharo Afghanistan, el alelo responsable de la "resistencia a la nodulación" es un carácter recesivo Mendeliano (Hombrecher et al., 1984). Sería interesante entender las bases genéticas del modo alternativo de infección de P. vulgaris.

Perspectivas en especificidad.

Los datos de la comparación estructural de los plásmidos simbióticos de diferentes cepas de Rhizobium capaces de nodular P. vulgaris muestran que existe homología entre ellos. El plásmido de la CFN 249 (de Dalea) tiene homología con las cepas de R. phaseoli, CFN 42 (nifH reiterada) y CIAT 899 (copia única nifH). Será interesante responder si estas secuencias conservadas son aquellas involucradas en el proceso simbiótico, lo que permitirá entender las relaciones filogenéticas de estos plásmidos (v.g. que tuvieran un origen común).

Las diferencias de especificidad y adecuación encontradas entre las diferentes cepas pudieran estar dadas por un número pequeño de genes diferentes. Si esto fuera cierto se-

ría posible complementar a las cepas nifH reiteradas para ampliar su espectro de infección (v.g. a Leucaena) y a los Rhizobia spp no específicos para nodular abundante y tempranamente.

Si la especialización de las cepas R. phaseoli implicara información genética accesoria incompatible con las necesidades simbióticas para Leucaena, entonces por complementación con secuencias de rhizobia que nodulan Leucaena no se logrará ampliar el espectro de infección de R. phaseoli nif reiterado. En este caso habrá que mutagenizar a la CFN 42 y buscar una ampliación en el espectro de infección.

Actualmente estoy realizando algunos experimentos en vías de ampliar el espectro de nodulación de R. phaseoli - CFN 42.

Es de esperar que existan diferencias en las capacidades simbióticas entre distintas cepas de R. phaseoli con reiteraciones de nifH. Datos en la literatura sugieren esto (Graham y Halliday, 1977). Sin embargo esta heterogeneidad no invalidará las conclusiones generales del trabajo. Aparte de las funciones de simbiosis, las funciones de Rhizobium en su contexto ecológico tendrán repercusiones en el desempeño simbiótico de las cepas. De estas funciones de interacción con el medio (con el suelo y con microorganismos como bacterias, hongos y nemátodos) se sabe muy poco. Existe un reporte sobre incrementos en la nodulación en Vigna, en soya y en trébol cuando se inocula Azotobacter vinelandi simultáneamente con el Rhizobium - específico (Burns et al., 1981). Se sabe de las ventajas de la inoculación simultánea de Rhizobium con micorrhiza (Bethlenfalvay et al., 1982) y de la depredación de Rhizobium por nemátodos.

La producción de diversas bacteriocinas así como la inmunidad a ellas (funciones plasmídicas también) seguramente tendrán repercusión en la colonización de la rizosfera y en la

exclusión de otros microorganismos. Efectos semejantes tendrá la utilización por Rhizobium de compuestos específicos sintetizados por la planta. R. leguminosarum puede catabolizar la homoserina que excreta chícharo (Dart, 1974). Datos preliminares de Tempé indican que alfalfa produce compuestos específicos que promueven el crecimiento de R. meliloti.

La construcción de cepas de Rhizobium deberá considerar, en un futuro, concertar paquetes simbióticos de especificidades diversas con paquetes genéticos que impliquen distintas potencialidades de interacción con el medio ambiente.

CUADRO 2

Homología de la nitrogenasa reductasa de R. phaseoli (Quinto et al., 1985) y de R. meliloti (Kondorosi, 1984) con otros organismos.

Bacterias	% de homología con <u>R. phaseoli</u> CFN 42		% de homología con <u>R. meliloti</u> RM 41	
	Aminoácidos	Pares de bases	Aminoácidos	Pares de bases
<u>R. meliloti</u> 41	93	76		
<u>R. trifoli</u> SU 329	88	77		
<u>Parasponia Rhizobium</u> ANU 289	79	72		
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	69	67	67	66
<u>Anabaena</u> 7120	68	59	70	63
<u>Azotobacter vinelandii</u>	68	-		
<u>Clostridium pasteurianun</u>	64	-	60	

CUADRO 3.

Mapas físicos de las regiones *nod* y *nif* de diferentes cepas de *R. meliloti*: Rm 41 (Kondorosi *et al.*, 1983), Rm 1021 - - (Buikema *et al.*, 1983), Rm 102 F 34 (Cordin *et al.*, 1983); de diferentes cepas de *R. leguminosarum* 3688, pRL1J1 (Downie *et al.*, 1983), TOM, pRL5J1 (Hombrecher *et al.*, 1984) y de *R. trifolii* ANU843 (Shine *et al.*, 1983).

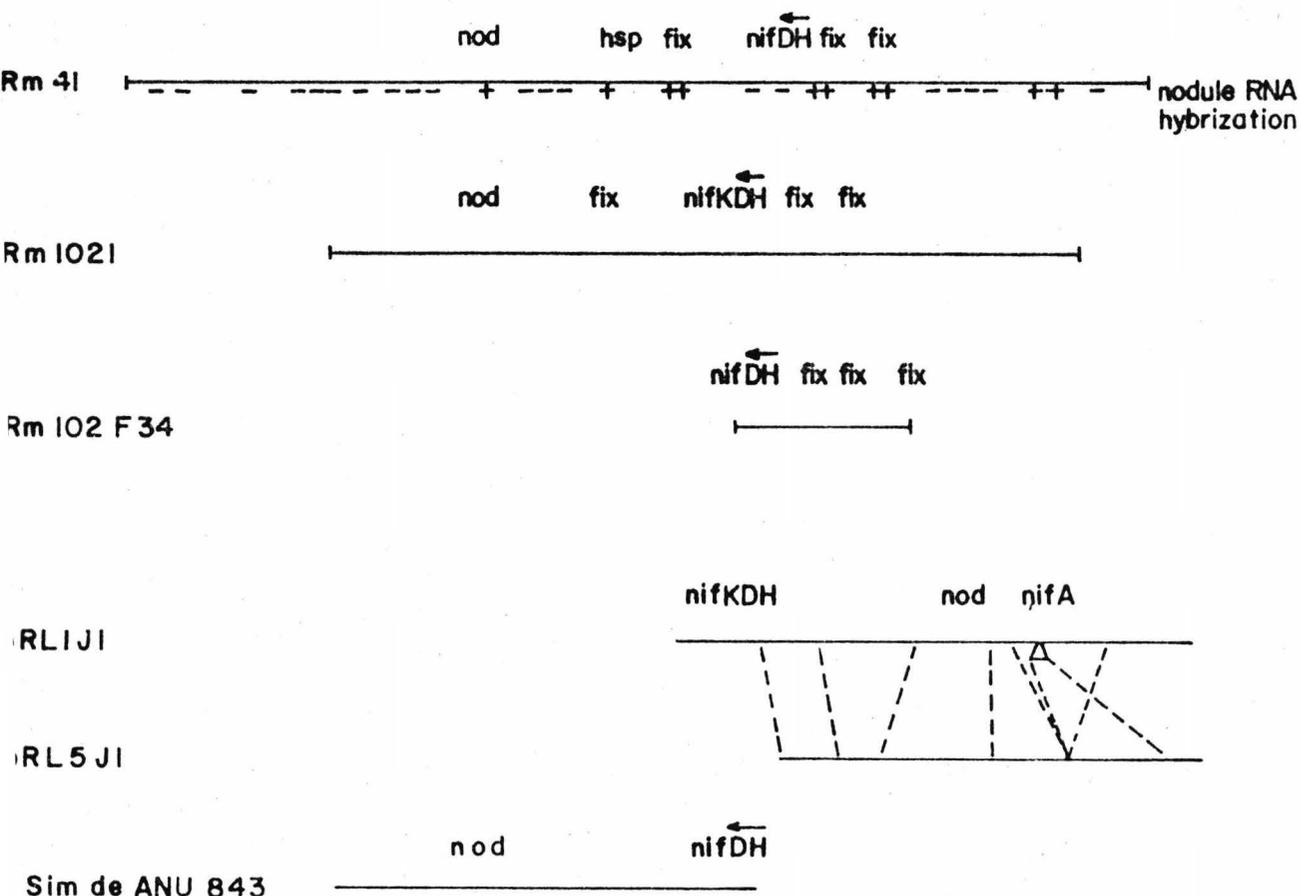


Table 1 Rhizobium strains and pattern of nifH gene reiterations

52

Strains isolated from <u>P. vulgaris</u>	Origin	<u>nifH</u> gene hybridization pattern ¹
FN 1	México	I
2	"	I
5	"	I
6	"	I
7	"	I
10	"	I
17	"	I
20	"	I
22	"	II
23	"	I
25	"	III
36	"	I
38	"	II
39	"	I
42	"	I
44	"	I
81	"	II
88	"	I
90	"	I
272	"	I
273	"	I
276	"	I
277	"	I
278	"	II
279	"	II
280	"	I
281	"	I
283	"	II
284	"	II
275	"	V
285	"	IV
286	"	IV
Nitragin USA 8184	Nitragin	I
" " 8251	England	I
Brazil 10	Brazil	II
" 1020 ^{3a}	Brazil	*
" 1026 ^{3b}	Brazil	*
China 14	USA	III
AT 896	Colombia	II
AT 899	Colombia	*
Brazil 281	Brazil	II
Other strains ²	Origin	Pattern
FN 226	México	II
227	"	I
238	"	IV
251	"	I
307	"	III
308	"	I
309	"	I
245	"	I

Hybridization patterns defined in Fig. 1.

For source of strain see table 2.

Obtained from Dr. P. Graham, St. Paul, Minn. USA.

a) Originally from Dr. Caio Vidor, C18.

b) Originally from Dr. Tsai Saito, CENA 183.

Obtained from E. Schmidt from St. Paul, Minn. USA,

only a single nifH hybridization band is observed

Table 2. Origin of Rhizobium strains studied

Strain No.	Original host legume
CFN 225	<u>Acacia albida</u>
CFN 255	<u>Centrosema pubescens</u>
CFN 264	<u>Crotalaria mollicula</u>
CFN 241	<u>Crotalaria pumila</u>
CFN 231	<u>Dalea leporina</u>
CFN 232	<u>Dalea leporina</u>
CFN 233	<u>Dalea leporina</u>
CFN 242	<u>Dalea leporina</u>
CFN 243	<u>Dalea leporina</u>
CFN 249	<u>Dalea leporina</u>
CFN 265	<u>Leucaena esculenta</u>
CFN 234	<u>Leucaena leucocephala</u>
CFN 244	<u>Macroptilium gibbosifolium</u>
CFN 246	<u>Medicago denticulata</u>
CFN 245	<u>Pachyrhizus erosus</u>
CFN 226	<u>Phaseolus acutifolius</u>
CFN 227	<u>Phaseolus acutifolius</u>
CFN 251	<u>Phaseolus acutifolius</u>
CFN 238 ¹	<u>Phaseolus coccineus</u>
CFN 307	<u>Phaseolus vulgaris</u> , wild-type
CFN 308	<u>Phaseolus vulgaris</u> , wild-type
CFN 309	<u>Phaseolus vulgaris</u> , wild-type
CFN 253	<u>Vicia sativa</u>
CFN 254	<u>Vigna vexillata</u>

1. Strain obtained from Dr. N. Amarger, as DC 11, isolated in France.

TABLA 3

NODULACION Y FIJACION DE NITROGENO EN P. VULGARIS DE
ALGUNAS CEPAS DE RHIZOBIUM.

A CEPAS	PESO DE NODULO (mg/planta) a	ACTIVIDAD ESPECIFICA DE REDUCCION DE ACETILENO (μ molas de etileno/gr/hora)
CFN 42	76.9	106.5
CFN 244 (de <u>Macroptilium gibbosifolium</u>)	36.4	95.3
CFN 265 (de <u>Leucaena esculenta</u>)	41.1	22.4
CFN 248 (de <u>Leucaena pulverulenta</u>)	32.1	43.2
CFN 241 (de <u>Crotalaria pumilá</u>)	20.3	72.5
CFN 243 (de <u>Dalea leporina</u>)	16.5	54.4
CFN 341 (derivada de 243)	26.75	140.9
CFN 249 (de <u>Dalea leporina</u>)	24.8	64.3
CFN 325 (derivada de la 249)	40.9	152.9
CFN 42	110.9 ^b	90.5 ^b
CFN 249 (de <u>Dalea leporina</u>)	74.1 ^b	52.0 ^b
CFN 325 (derivada de 249)	99.79 ^b	78.5 ^b
	Peso seco de plantas de <u>P. vulgaris</u> ^b	
B CEPAS	(% del peso obtenido con la CFN 42)	
CFN 243 (de <u>Dalea</u>)	39.9%	
CFN 249 (de <u>Dalea</u>)	29.4%	
CFN 325 (derivada de 249)	50.18%	
CFN 241 (de <u>Crotalaria</u>)		

a) promedio de 4 plantas en matraz

b) promedio de 4 plantas en jarras Leonar

TABLA 4

NODULACION EN LEUCAENA ESCULENTA

CEPA	NUMERO DE NODULOS POR PLANTA a)	ACTIVIDAD ESPECIFICA DE REDUCCION DE ACETILENO (μ molas de etileno/gr/hora)
CIAT 899	5.5	48.06
UMR 1020	6.5	50.3
UMR 1026	5.5	52.06
CFN 265 (de <u>Leucaena</u> <u>esculenta</u>)	6	49.66

a) promedio de 4 plantas
en frascos.

TABLA 5

Cepa	Aislada de:	Nodulación en <u>P. vulgaris</u>	Fijación
L 3	<u>Phaseolus lunatus</u>	+	-
L 59	<u>Phaseolus lunatus</u>	+	-
L 61	<u>Phaseolus lunatus</u>	+	-
Pac 7	<u>Pachyrhizus erosus</u>	+	+
Pac 67	<u>Pachyrhizus erosus</u>	+	+
Pac 69	<u>Pachyrhizus erosus</u>	+	+
Pac 72	<u>Pachyrhizus erosus</u>	+	+
Pac 74	<u>Pachyrhizus erosus</u>	+	+
Pac 75	<u>Pachyrhizus erosus</u>	+	+
S 10	<u>Phaseolus vulgaris silvestre</u>	+	+
S 23	<u>Phaseolus vulgaris silvestre</u>	+	+
Ors 571	<u>Sesbania rostrata</u>	-	
USDA 191	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 192	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 193	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 194	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 201	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 205	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 206	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 208	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 214	<u>Glycine</u>	+*	-
USDA 217	<u>Glycine</u>	+*	-

* pocos nódulos y
chiquitos

Fig. 1 Autoradiograms of Southern blots of BamH1-digested genomic DNA of different R. phaseoli strains after hybridization with a 300 bp nifH internal sequence from R. phaseoli CFN-42. Hybridization patterns I - V are defined by the sizes of the fragments. Strains : (A) CFN-42, (B) CFN-279, (C) CFN-25, (D) CFN-285, (E) CFN-275, (F) CIAT 899.

Fig. 2 Nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris and nifH reiterations in rhizobia isolated from legumes whose taxonomic relations are shown.

Fig. 3 Autoradiograms of Southern blots of BamH1-digested genomic DNA of different Rhizobium strains hybridized with a 300 bp nifH internal sequence of R. phaseoli CFN-42. (A) CFN-241 (a Rhizobium from Crotalaria pumila), (B) CFN-241, after reisolation from bean nodules, (C) CFN-249 (a Rhizobium from Dalea leporina), (D) CFN-249, after reisolation from bean nodules, (E) CFN-243 (a Rhizobium from Dalea leporina), (F) CFN-243, after reisolation from bean nodules, (G) CFN-42, reference R. phaseoli strain.

Fig. 4 nifH gene hybridization patterns of five strains of Rhizobium isolated from nodules of Phaseolus vulgaris grown in soils were Leucaena spp. grew. (A) CFN-313, this strain behaves like other "nifH reiterated" R. phaseoli, (B) CFN-288, (C) CFN-289, (D) CFN-311,

(E) CFN-290. These strains resemble Leucaena symbionts in their ability to nodulate L. leucocephala and their unique nifH copy.

Fig. 5 Ensayos de nodulación de Leucaena leucocephala.

Fig. 6 Desarrollo de plantas de Leucaena esculenta de 21 días crecidas en frascos con agar-Fahraeus, como los mostrados en la fig. 5. La de la izquierda es una planta testigo no inoculado y la de la derecha estaba nodulada por la cepa de R. phaseoli UMR 1020.

Fig. 7 Nódulos formados en Leucaena esculenta por R. phaseoli UMR 1020. La parte aérea se muestra en la fig. 6.

Fig. 8 Nódulos formados en Leucaena esculenta por R. phaseoli CIAT 899.

Fig. 9 Caracterización de las cepas UMR 1020 y 1026 A) autorradiografías de genomas totales después de hibridar con una secuencia interna del gene nifH de R. phaseoli. Carril a, UMR 1020; carril b, UMR 1026; a la derecha se muestra un diagrama de la banda de hibridación de la CIAT 899.

B) Pérofiles de plásmidos de las cepas R. phaseoli. Carril a, UMR 1020; b, UMR 1026; c, CFN 42.

C) Patrones de digestiones totales de genomas obtenidos con la enzima de restricción BamH1 de las cepas a, UMR 1020; b, UMR 1026 y c, CIAT 899.

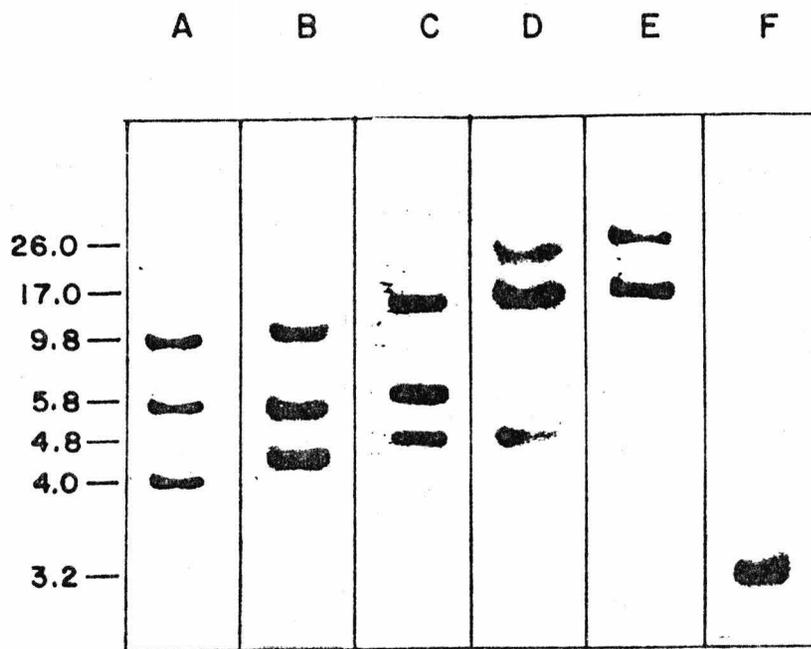
Fig. 10 Diagrama en el que se esquematizan los tamaños de los plásmidos simbióticos de diferentes cepas de R. phaseoli a) CIAT 899; b) CFN 42; c) UMR 1026 y de Rhizobium spp d) CFN 249 (de Dalea).

Fig. 11 Características del plásmido simbiótico (pDal) de la CFN 249 (de Dalea) carril a) Perfil de digestión con BamHI del plásmido purificado, b) autorradiografía de la hibridación de este plásmido (pDal) con el plásmido simbiótico de la CIAT 899, marcado con ^{32}P .

Fig. 12 Autorradiografías que muestran la homología entre el plásmido pDal de la CFN 249 (de Dalea) y las cepas de R. phaseoli CFN 42, carril a) y CIAT 899 carril b). El plásmido purificado de la CFN 249 se utilizó como detector radiactivo y se hibridizó contra un patrón de genoma total de esas cepas.

Fig. 13 Datos de Graham, 1981 en los que se muestran las actividades de nitrogenasa, medidas como reducción de acetileno, a lo largo del ciclo de cultivo utilizando diferentes cultivares de P. vulgaris.

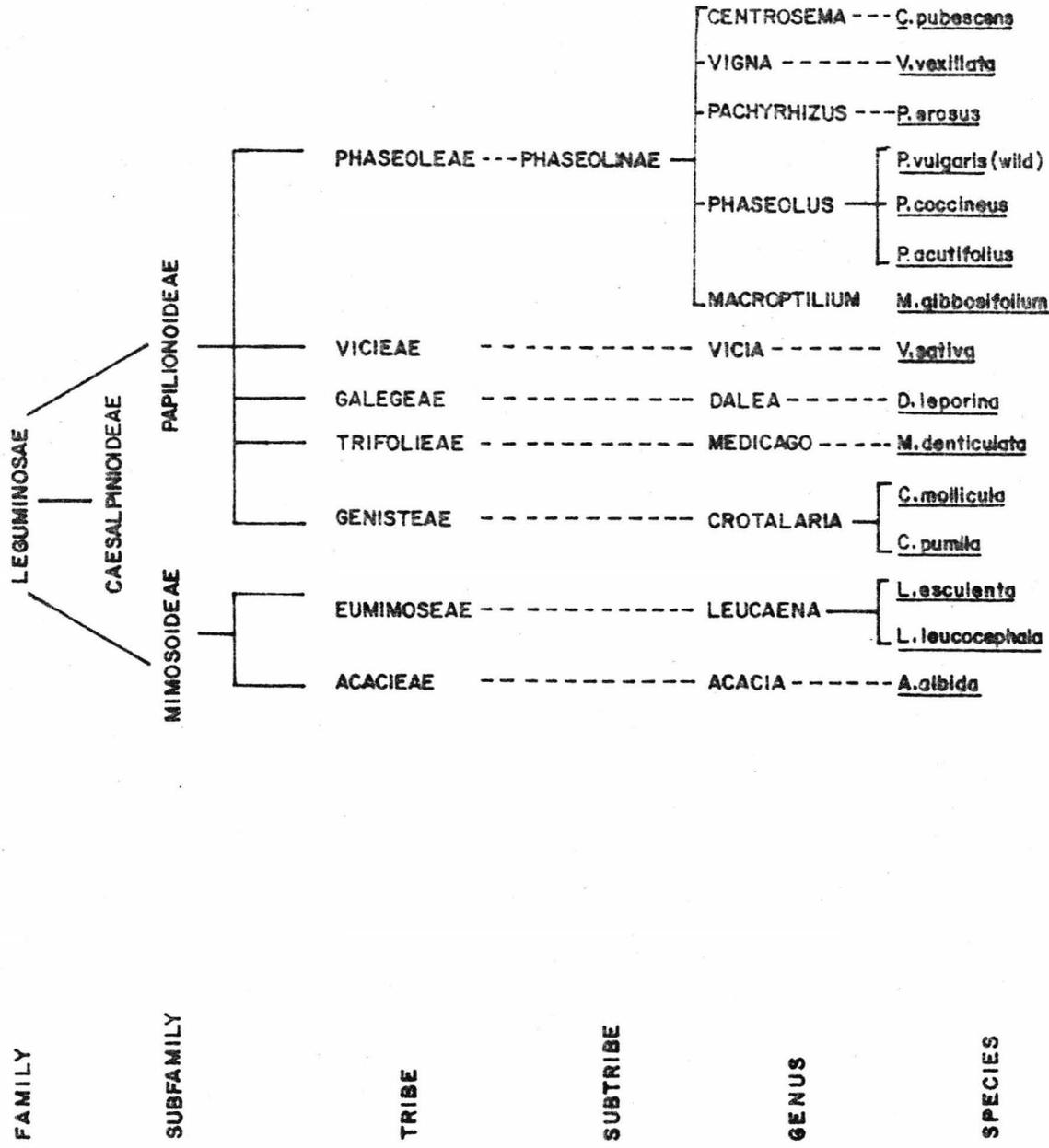
Fig. 14 Corte ilustrativo de una raíz en donde se muestran los pelos radiculares, epidermis, los espacios intercelulares, la corteza, etc.



Tipos
de patrón
de reiteración

I II III IV V VI

Fig. 1



—	—	—
+ -	—	—
+	+	3
+	+	3
+	+	3
+	+	—
—	—	—
+	+	—
+	+	—
+	—	—

Nodulation of P. vulgaris
 Nitrogen fixation of P. vulgaris
 Number of Bam HI bands
 revealed by hybridization
 with R. phaseoli nif H probe

Fig. 2

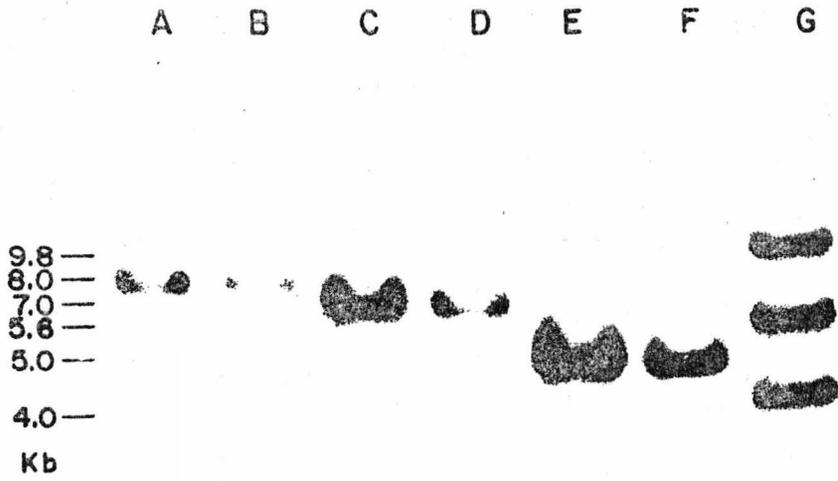


Fig. 3

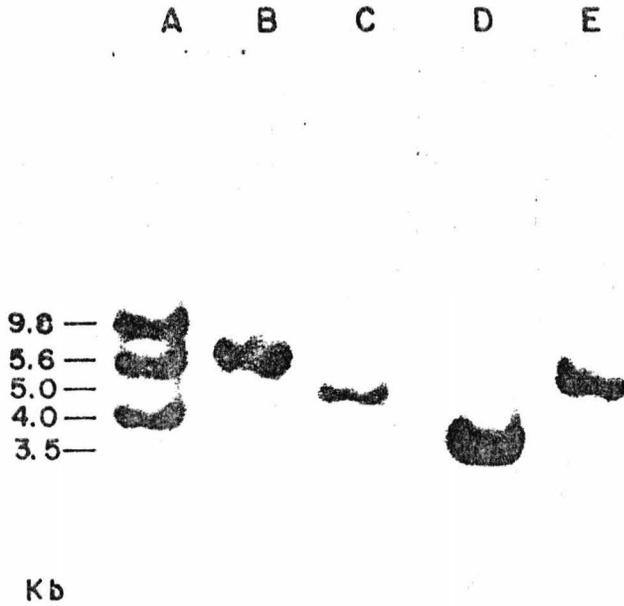


Fig. 4



Fig. 5

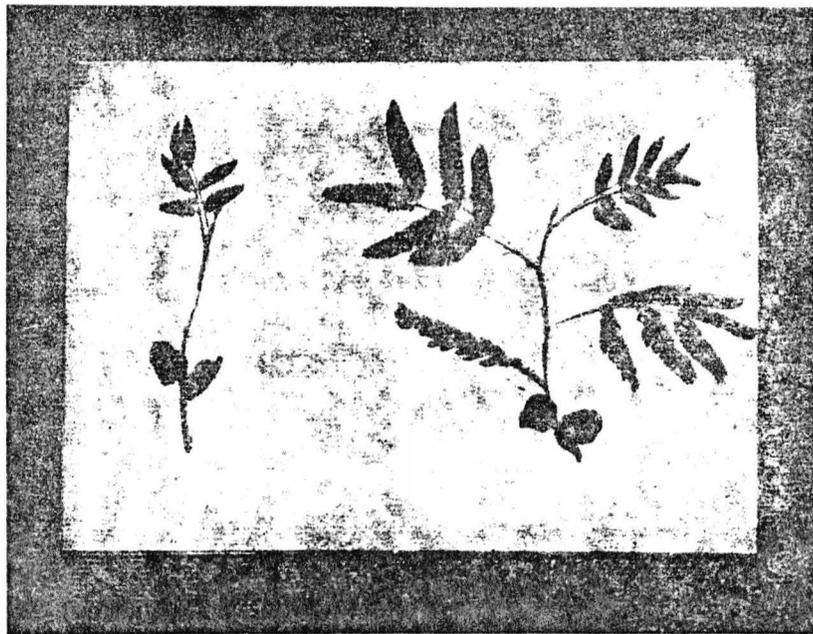


Fig. 6

Fig. 7

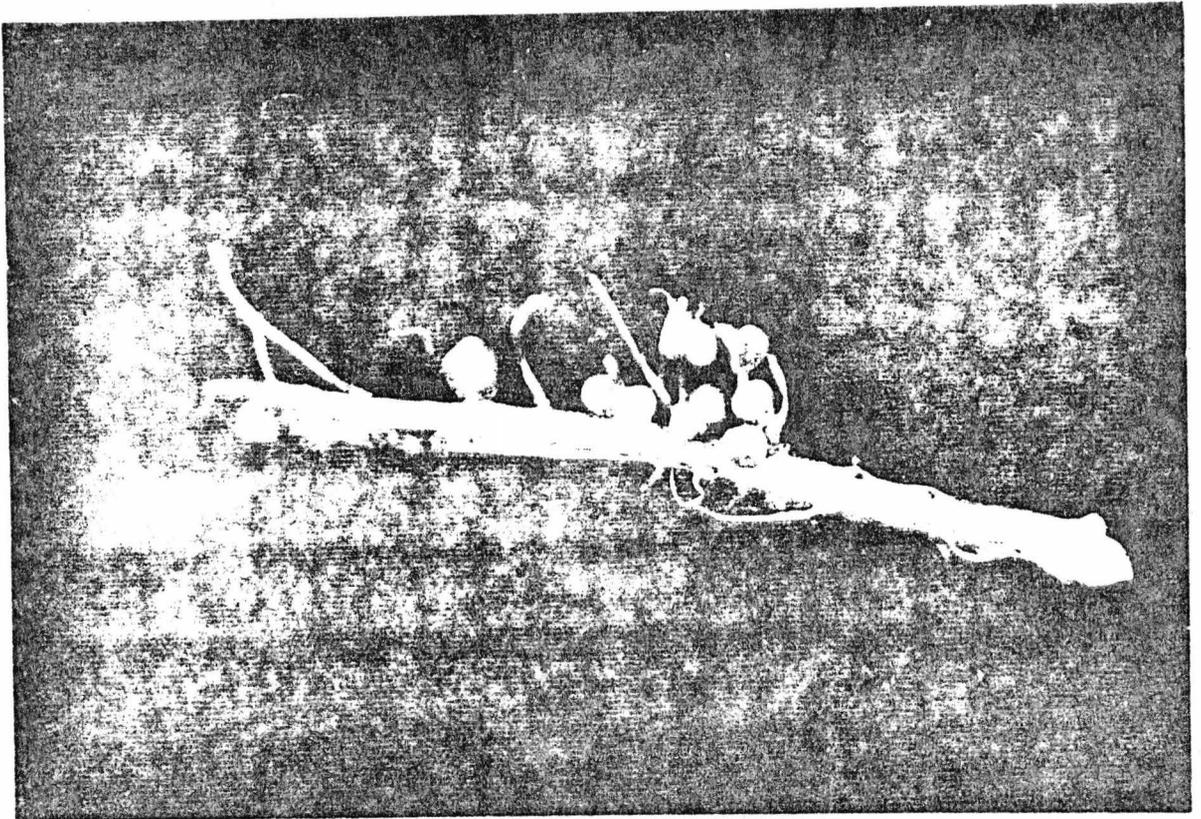
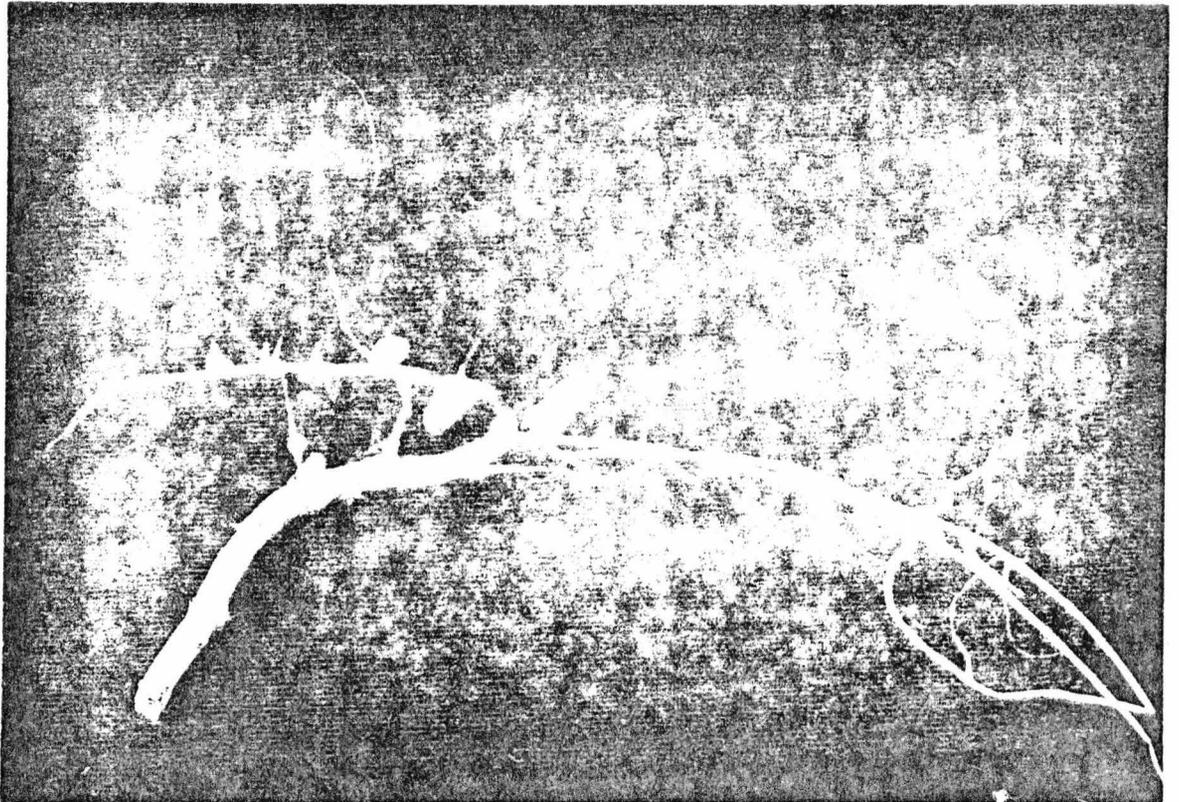
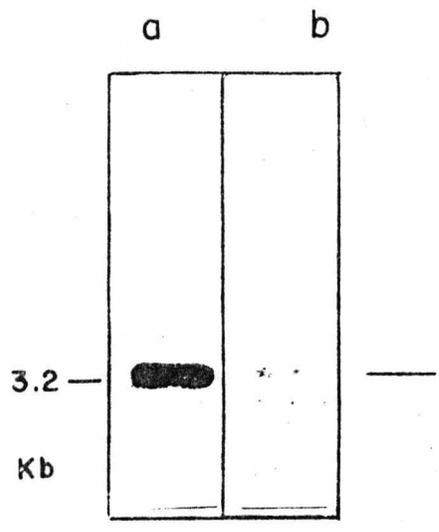


Fig. 8

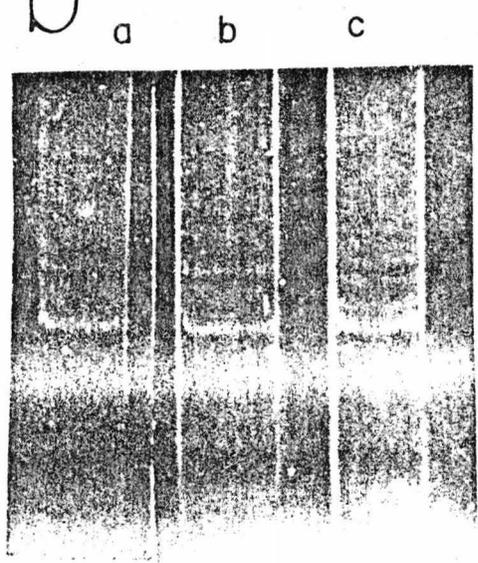


9

a



b



C



Fig. 10

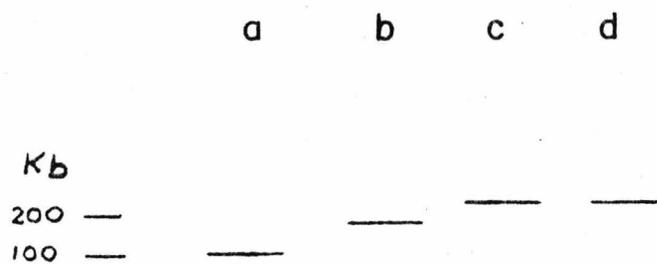


Fig. 11

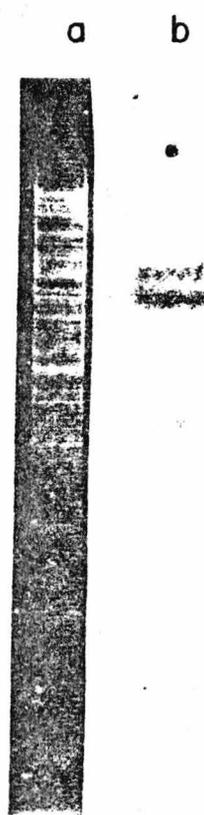


Fig. 12

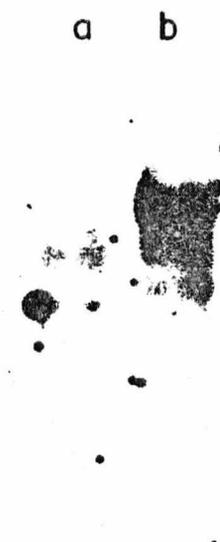
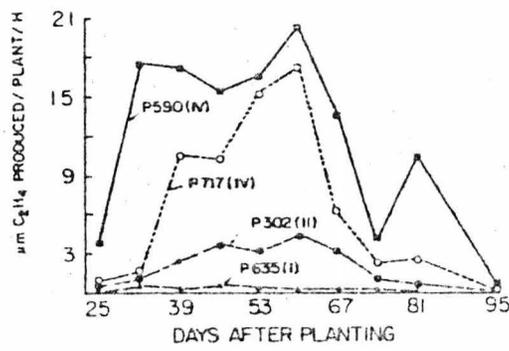
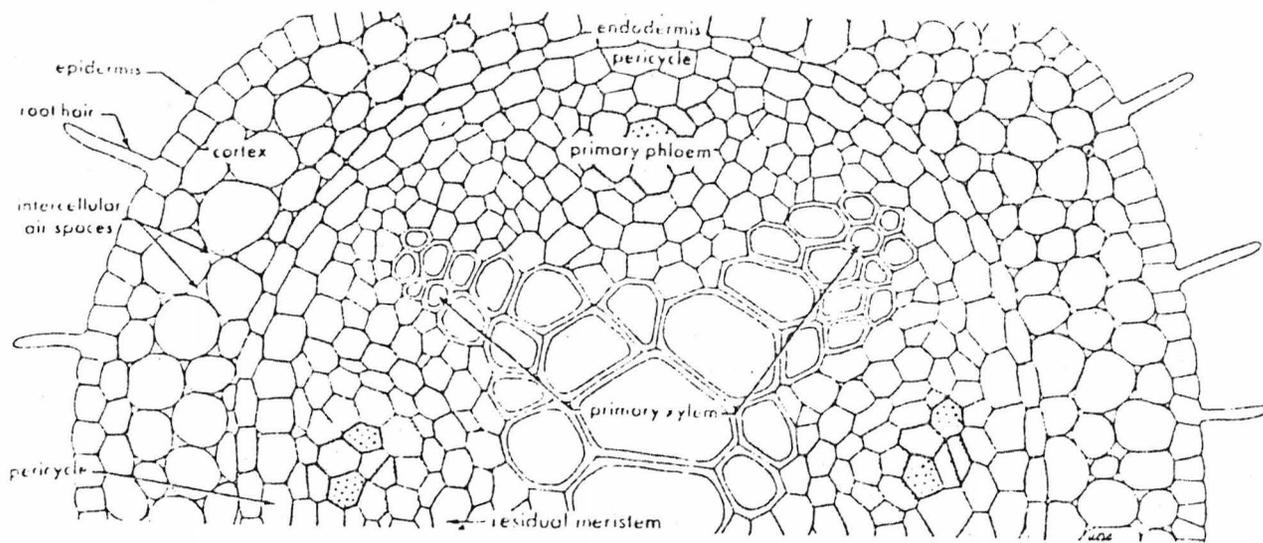


Fig. 13



Tomado de Graham, 1981.

Fig. 14



Tomado de Weier et al., 1982.

APENDICE

MEDIOS DE CULTIVO

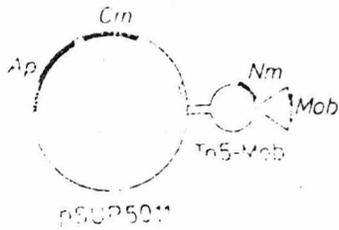
PY		BYLA	
Peptona de caseína	5 gr	K_2HPO_4	0.5 g
Extracto de levadura	3 gr	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$CaCl_2$	0.809 gr	$CaCl_2$	0.2 g
Agar	15 g	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.05 g
H_2O cbp	1 litro	Extracto de levadura	3.0 g
		Agar	15 g
		H_2O cbp	1 litro
PA		MY	
Peptona de caseína	4 gr	K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4$	2 ml	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
Agar	15 g	NaCl	0.1 g
H_2O cbp	1 litro	Manitol	10 g
		Extracto de levadura	1.0 g
		Agar	15 g
		H_2O cbp	1 litro
LB		FAHRAEUS mg/lt	
Peptona de caseína	10 gr	Na_2HPO_4	150
Extracto de levadura	5 gr	KH_2PO_4	100
NaCl	10 gr	$CaCl_2$	100
NaOH 10M	250	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	120
Agar	20	Citrato de fierro	5
H_2O cbp	1 litro	Trazas Gibson	

Apéndice.

I Transferencia del plásmido sim de las cepas UMR 1020 y UMR 1026 a Agrobacterium.

- 1). Crecer en cajas las cepas UMR1020 y 1026 en PY Nalidíxico 10 µg/ml y la cepa de E. coli Sml7 (pSup mob = pSup5011) en LB Cm 25 Nm 25.
- 2). Crecer las cepas de Rhizobium en 3-5 ml PY líquido sin - antibiótico 12 hrs a 29°C y la cepa de E. coli en 3 ml de LB líquido 4-5 hrs a 37°C.
- 3). Platear 120-150 µl de Rhizobium y 80 µl de E. coli en cajas PY y dejar la cruza 12 hrs o más.
- 4). Recoger la cruza en 3 ml de MgSO₄ 10⁻² M. y hacer diluciones 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶.
- 5). Platear 0.1 ml de diferentes diluciones y también de los controles en el medio selectivo PY Nal₁₀ Kan₃₀.
Nota: Las transconjugantes que crecieron en PY Nal₁₀ Kan₃₀, casi no crecen PY Nal₁₀ Cm 25 Nm 25.
- 6). Picar las colonias de Rhizobium mutagenizadas con Tn5 en PY Nal₁₀ Kan₃₀.
- 7). Crecer Gmi 9023 Nif^r en LB Rif100 en caja y JM83 (pRK - - 2013) en LB Tc 10. Inocularlos en LB líquidos, crecer 12 hrs el Agrobacterium y 4-5 hrs E. coli.
- 8). Mezclar 0.5 ml GMI 9023 y 0.1-0.2 ml pRK 2013 y platear - 100 ken cajas de PY. Una vez seco picar las colonias de - Rhizobium mutagenizadas con Tn5.
- 9). Seleccionar por réplica en LB Rif 100 Kan 25 Nm 25 también los controles. Estriar las colonias.

10. Crecer en LB los Agrobacterium transconjugantes para inocular plantas.



pSup 5011 (Simon et al 1983).

Extracción de ADN

1. Utilizar 5 ml de cultivos líquidos en PYÓPA con buen crecimiento.
2. Centrifugar las células en tubos Eppendorf 2' en la microfuga o 5' a 7K en tubos corex.
3. Lavar la pastilla con 500 µl de TE 50:20) (TE = Tris HCl 50 mM/EDTA 20 mM, pH 8). Resuspender en 400 µl de TE y añadir 50 µl de Pronasa (5 mg/ml de TE, predigerida 1- 1:30 hr) y 50 µl de SDS 10% en TE. Se pueden añadir también 5 µl de RNasa (10 mg/ml). Incubar a 37°C 1 hr ó más.
4. Pasar este lisado dos veces a través de una jeringa.
5. Extraer con 1 volumen de fenol, (saturado en TE, pH8) y dos veces con dos volúmenes de cloroformo.
6. La fase acuosa se precipita con 1/10 de volumen del sobrenadante de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol (-20°C) durante 12 hr.
7. Centrifugar la pastilla y disolverla en 500 µl de TE 10:1 (Tris HCl 10mM/EDTA/mM, pH8).
8. Agregar 5 µl de RNasa a (10 mg/ml, hervida previamente 10'). Incubar 1:30 hrs, a 37°C.
9. Repetir paso 5 y 6.
10. Centrifugar la pastilla 10' en frío, lavarla con 100 µl de etanol 70% (frío) dos veces.
11. Resuspender la pastilla en 30 - 50 µl de TE 10:1 ó en H₂O.
12. Congelar a -20°C.

Otra manera de extraer DNA

1. Crecer cultivos líquidos de 50 ó 100 ml de Rhizobium.
2. Centrifugar las células a 7 000 rpm, 15 min a 4°C en rotor de ángulo fijo.
3. Lavar las células, resuspendiéndolas en 10 ml de NaCl 0.85%.
4. Repetir paso 2.

5. Resuspender en 5 ml de buffer SET (sacarosa 25%, Tris HCl 50mM pH 8, EDTA 1mM), añadir 1.5 ml EDTA 0.25 M, 0.5 ml de lisozina 5 mg/ml (en 0.25 mM Tris pH 8) y 50 μ l de RNasa 10 mg/ml (0.1 M CH₃COONa; 3.3x 10⁻⁵ M EDTA pH8, tratada 10 min a 85°C).
 6. Mezclar y dejar reposar 15' en hielo.
 7. Adicionar 1.5 ml de la mezcla lítica Tritón x 100, 3x, mezclar suavemente y dejar en hielo 15 min.
Mezcla lítica Tritón x 100, 3X, guardarla a 4°C.
- | | | |
|--------------------------------------|-----|-------|
| Tritón x 100-10% en H ₂ O | --- | 3 ml |
| 0.25 M EDTA pH8 | --- | 75 ml |
| Tris 1 M pH8 | --- | 15 ml |
| H ₂ O | --- | 7 ml |
8. Adicionar 1/10 vol de Proteinasa K ó de Pronasa ó de Proteasa de Extracto de Streptococcus griseus (5mg/ml en Tris HCl 50 mM pH 7.5) predigeridas 60' a 37°C.
 9. Incubar 60' a 37°C con agitaciones suaves ocasionalmente.
 10. Adicionar 2 volúmenes de cloroformo: fenol: alcohol isomérico (25: 25: 1). El fenol debe de ser saturado. Agitar suavemente durante 3'.
 11. Centrifugar a 10,000/rpm a temperatura ambiente 10 min.
 12. Repetir el paso 12.
 13. Extraer 2 veces con dos volúmenes de cloroformo.
 14. Precipitar el ADN, con 1/10 vol. de NaCl 2M y 2 vols. de etanol frío durante 12 hrs a -20°C.
 15. Centrifugar a 10,000/rpm, 30' a 4°C.
 16. Secar la pastilla (al vacío o con aire)
 17. Solubilizar la pastilla en 1-3 ml de Tris HCl 50mM/EDTA 2mM, pH 7.5.
 18. Tratar con RNasa (5 mg/ml) en Tris HCl 50 mM/EDTA 2mM, pH 7.5, a una concentración final de 0.1 mg/ml.
 19. Incubar 60 min a 37°C.
 20. Repetir pasos 12-17.
 21. Lavar la pastilla tres veces con etanol 70% y secarla y resuspenderla en TE 10:1.
 22. Dializar toda la noche contra 4 lt de buffer TE pH8 ó

HIBRIDACION

1. Preparar la bolsa de hibridación e introducir el filtro con los 4 lados sellados.

2. Mezcla de Prehibridación e hibridación.

100x DENHARDT	1.0 ml
20x SSC	2.5 ml
Buffer PO_4^-	1.0 ml
	<hr/>
	4.5 ml

3. En un tubo agregar 2.25 ml de la mezcla más 2 ml de agua estéril.

4. En un tubo eppendorf agregar; 0.085 ml DNA tt más 0.665 ml H_2O ; hervir 10' en Baño Ma. a ebullición, pasar a hielo 5'.

5. Cortar la bolsa por una esquina e introducir con pipeta las dos mezclas anteriores mojando completamente el filtro.

6. Cerrar la bolsa y checarla.

7. Incubar 2 horas a 65°C.

8. Cortar la bolsa por una esquina y vaciar el contenido a modo de que el filtro quede completamente seco y agregar la mezcla de hibridación. (marca *)

9. En un tubo agregar los 2.225 ml de la mezcla más 2.5 ml de H_2O .

10. En un tubo eppendorf agregar 0.085 ml de DNAtt, 0.5 ml de agua estéril más el volúmen de 32_p; poner el Baño Ma. a ebullición durante 10'; pasar a hielo 5'.

11. Vaciar las dos mezclas a la bolsa y sellarla perfectamente.

12. Incubar 12 a 14 horas a 65°C, dentro de la caja de acrílico.

LAVADO DE FILTROS

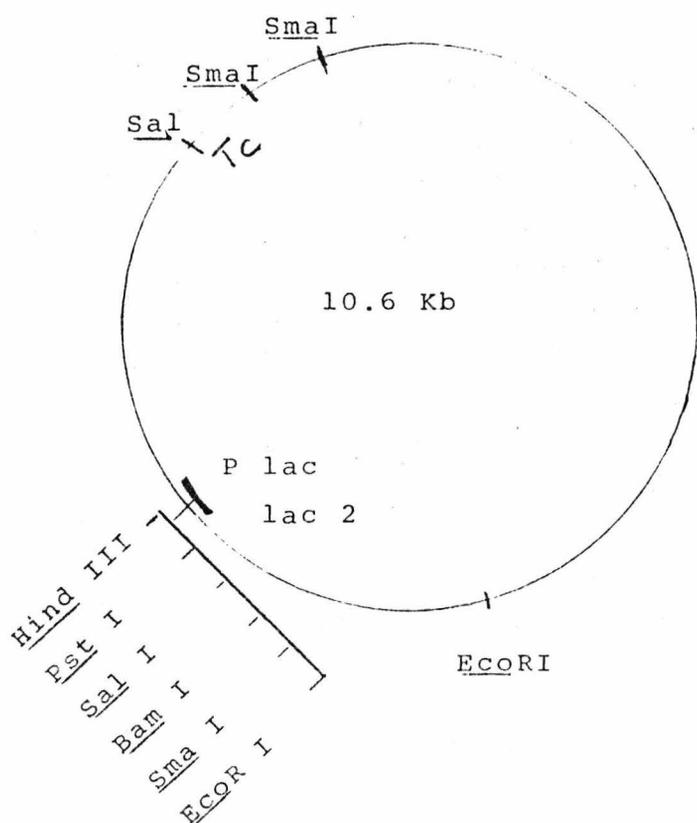
1. Abrir la bolsa por una esquina.

* El volumen del agua y de la marca variará según las cuentas en los puls que se vayan a utilizar.

2. Vaciar el contenido de la bolsa en los frascos de desecho radioactivo.
3. Lavar el filtro con 20 ml de 2x SSC y volver a desechar, romper la bolsa completamente y sacar el filtro.
4. Lavar durante 10' con 2x SSC más 0.1% SDS a temperatura ambiente.
5. Lavar durante 20' a 50°C con 0.1x SSC más 0.1% SDS, checar con el Geiger, en caso de que el filtro tenga mucha marca volver a lavarlo las veces que sea necesario y dar una o dos lavadas más de 20' cada una si fuera necesario.
6. Lavar con 0.1x SSC a temperatura ambiente durante 10' hasta que quede completamente limpio.
7. Colocar el filtro entre dos sanitas y secar 15' a 65°C.
8. Colocar el filtro sobre una superficie dura, cubriéndolo con ega-pack.
9. Ponerlo en un cassett con un film, en el cuarto oscuro y guardarlo a -70°C.
10. A las 12 ó 18 hrs. revelar el film.

II Clonación del plásmido simbiótico (p Dal) de la CFN 249 en el vehículo pRK 404

pRK 404



10 copias

Receptor JM83 ara Δ lac

pro str A

\emptyset 80 lac 2

Δ M15

no requiere IPTG

CLONACION

1. Digestión parcial de 3 μ g de DNA del pDal con la enzima de restricción BamHI, durante 15 min a 37°C.
2. Digestión total de 10 μ g del pRK404 con BamHI.
3. Fosfatar el vehículo:
 - i) extraer con fenol - cloroformo - isoamílico 2 veces
 - ii) extraer con cloroformo isoamílico 1 vez
 - iii) precipitar con 0.3 M acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol
 - iv) lavar la pastilla con etanol al 70% y secar

- v) resuspender en 285 μ l de H_2O
 - vi) agregar 15 μ l de 1M tres pH8 (0.05 M final)
 - vii) agregar 5 unidades de fosfatasa alcalina por μ g de ADN
 - viii) incubar 2 hrs a 65°C
 - ix) parar la reacción con 1mM EDTA
 - x) repetir pasos del i) al iv)
4. Ligar. Se utilizó una relación 5:1, vehículo pasajero; volúmen final de la mezcla 25 μ l conteniendo 2.5 μ l 10mM ATP, 2.5 μ l Buffer 10X Ligasa y 1.9 μ l Ligasa T 4, 0.5 μ g de pDal y 0.12 μ g de pRK 404, y H_2O , incubar la reacción toda la noche a 14°C.

Transformación

1. Crecer la cepa de E. coli JM 83 en 10 ml de LB líquido 12 hrs.
2. Diluir 1/100 en 50 ml de LB y crecer hasta 0.6 D.0 650 nm.
3. Cosechar las células por centrifugación a 4°C, 5 min 6K.
4. Lavar las células resuspendéndolas suavemente en aproximadamente 40 ml de 10 mM NaCl a 5°C. De nuevo centrifugar.
- 5 Resuspender 4n 40 ml de buffer de transformación a 5°C e incubar en hielo por 20'.
6. Centrifugar a 6 K 10' a 5°C.
7. Resuspender las células en 1 ml de buffer de transformación frío.
8. Agregar 200.0 μ l de suspensión de células a 100 μ l de buffer de transformación que contiene la mitad de mezcla que se ligo.
9. Incubar en hielo 60'.
10. Calentar a 42°C por 2'.
11. Diluir la mezcla de transformación en 3 ml de LB e incubar a 37°C con agitación durante 2 hrs.
12. Platear 100 μ l en cajas de medio selectivo.

Nota: preparar el buffer de transformación al momento. Se puede añadir el calcio en polvo.

- Bethlenfalvay, G.J., Pacovsky, R.S., Bayne, H.G. & Stafford, A.E. (1982). Plant Physiology 70, 446-450.
- Beynon, J.L. & Josey, D.P. (1980). J. Gen Microbiol 118, 437-442
- Bond, G. (1976). En Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cap. 32 pp. 443-474. Harpenden, Inglaterra: P.S. Nutman.
- Brewbaker, J.L. (1975). College of Tropical Agriculture. Hawaii Agricultural Experiment Station Miscellaneous Publication 125, 1-4.
- Brill, W.J. (1980). Microbiological Reviews 44, 449-467.
- Broughton, W.J., Heycke, N., Meyer, H.Z.A. & Pankhurst, C.E. - (1984). PNAS 72, 3628-3632.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (1974). Bergey's Manual of - - Determinative Bacteriology 8th Ed., Williams and Wilkins, Balti more.
- Buikema, W.B., Long, S.R., Brown, S.E., van den Bos, R.C., - - Earl, C. & Ausubel, F.M. (1983). Journal of Molecular Applied - Genetics 2, 249-261.
- Burns, T.A., Bishop, D.E. & Israel, D.W. (1981). Plant and Soil 62, 399-412.
- Callaham, D.A., Torrey, J.G. (1981). Canadian Journal of Botany 59, 1647-1664.
- Catteau, M., Khanaka, H., Legrand, M.D. & Guillaume, J. (1984). En Advances in Nitrogen Fixation Research, P. 330. The Hague & Wageningen: Nijhoff, Junkd Pudoc.

- Akkermans, A.D.H., Hafeez, F., Roelofsen, W, Chaudhary, A.H. & Baas, R. (1984). En Advances in Nitrogen Fixation Research, pp. 311-319. The Hague & Wageningen: Nijhoff, Junk & Pudoc.
- Allen, O.N. & Allen, E.K. (1981). The Leguminosae. A Source Book Of Characteristics Uses and Nodulation. The University of Wisconsin Press.
- Appleby, C.A. (1974). Leghemoglobin en The Biology of Nitrogen - Fixation pp 521-554. North-Holland Research Monographs, Quispel Ed.
- Appleby, C.A., Tjepkema, J.D. & Trinick, M.J. (1983). Science 220, 951-953.
- Ausubel, F.M. & Cannon, F.C. (1981). Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology XLV, 487-499.
- Bal, A.K & Wong, P.P. (1982). Canadian Journal of Microbiology, 28: 890-896.
- Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I. & Kondorosi, A. (1981). Mol General Genetics 184, 318-325.
- Bauer 1981. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 407-449.
- Beringer, J.E., Johnston, A.W.B. & Wells, B. (1977). J. of Gen. Microbiol 98, 339-343.
- Beringer, J.E., Brewin, N.J. & Johnston, A.W.B. (1980) Heredity 45, 161-186.
- Bernaerts, M.J. & De Ley, J. (1963) Nature, London 197, 406-407.

Corbin, D., Barran, L. & Ditta, G. (1983). PNAS 80, 3005-3009.

Cristofolini, G. (1981). Serological Systematics of the Leguminosae. En Advances in Legume Systematics V.I. Eds. R.M. Polhill & P.H. Raven.

Crow, V.L., Jarvis, B.D.W. & Greenwood, R.M. (1981). International Journal of Systematic Bacteriology 31, 152-172.

Currier, T.C. & Nester, E.W. (1976). Journal of Bacteriology - 126, 157-165.

Dart, P.J. (1974). Cap. 11 The infection process. pp 382-429 en The Biology of Nitrogen Fixation, A. Quispel. Ed. London & New York.

Dart, P.J. (1977). Infection and development of leguminous - - nodules in A treatise on dinitrogen fixation, Hardy & Silver, eds. pp 367-472, John Wiley, New York.

Date, R.A. & Halliday, J. (1975). Relationships between Rhizobium and tropical forage legumes.

Dazzo, F.B. (1979). Capítulo 8 Adsorption of microorganisms to - roots and other plant surfaces. En Adsorption of Microorganisms - to Surfaces. pp 253-316, New York: Wiley.

De Jong, T. & Phillips, D.A. (1982), Plant Physiology 69, 416-420

Demoulin, V. (1979). Science 205, 1036-1038.

Dénarié, J., Truchet, G. & Bergeron, B. (1976). En Symbiotic - - Nitrogen Fixation in Plants. Cap. 4. pp 47-61. Harpenden; Inglaterra, P.S. Nutman, ed.

- Dixon, R.A., Alvarez - Morales, A., Clements, J., Drummond, M., Merrick, M. & Postgate, J.R. (1984). En Advances in Nitrogen - Fixation Research; P 635-649. The Hague & Wageningen: Nijhoff, Junk & Pudoc.
- Djordjevic, M., Zurkowski, W., Shine, J. & Rolfe, B. (1983). - Journal of Bacteriology, 156, 1035-1045.
- Dommergues, Y. (1984). En Advances in Nitrogen Fixation - - - Research. P 321. The Hague & Wageningen: Nijhoff Junk & Pudoc.
- Downie, J.A., Ma, Q.S., Knight, C.D., Hombrecher, G. & Johnston, A.W.B. (1983). The Embo Journal 2, 947-952.
- Downie, J.A., Hombrecher, G., Ma, Q.S. Knight, C.D. Wells, B. & Johnston, A.W.B. (1983a). Mol. Gen. Genetics 190, 359-365.
- Downie, J.A., Hombrecher, G., Ma, Q.S., Knight, C.D. & Johnston, A.W.B. (1983b). Genetic Analysis of pRL101, a Symbiotic Plasmid of Rhizobium leguminosarum en Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction. Springer Verlag, Berlin Heidelberg: - - A. Pühler ed.
- Eckhardt, T., 1978. Plasmid 1, 584-588.
- Elkan, G.H. (1984). Taxonomy and Metabolism of Rhizobium and its Genetic Relationships en Biological Nitrogen Fixation, Ed. M. Alexander, Plenum Press.
- Espin, G., Alvarez - Morales, A., Cannon, F., Dixon, R & - - Merrick, M. (1982). Molecular General Genetics 186, 518-524.
- Flaig, W., Nagar, B., Söchtig, H., Tietjen, C., (1977) in - - Organic Materials and Soils Productivity, pp 35-50 FAO Soils - Bulletin 35: Roma.

Forrai, T., Vincze, E., Banfalvi, Z., Kiss, G.B., Randhawa, G.S. & Kondorosi, A. (1983). Journal of Bacteriology 153, 635-643.

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., - - -
Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S.
Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, -
L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. & - -
Woese, C.R. (1980). Science 209, 457-463.

Gentry, H.S. (1969). Economic Botany 23, 55-69.

Goldblatt, P. (1981). Cytology and the Phylogeny of Leguminosae
en Advances in Legume Systematics VI. Eds R.M. Polhill & P.M. -
Raven.

Gomes, C.M.R., Gottlieb, O.R., Gottlieb, R.C. & Salatino, A.
(1981). Phytochemistry in perspective: Chemosystematics of -
the Papilionoideae en Advances in Legume Systematics VI. Eds.
R.M. Polhill & P.H. Raven.

Graham, P.H. (1964). Journal of General Microbiology 35, - -
511-517.

Graham, P.H. & Hubbell, D.H. (1975). Florida Agr. Exp. Sta. J.
Series No. 5439, 9-21.

Graham, P.H. (1976). En Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants
Cap. 9. pp 99-112. Harpenden, Inglaterra, P.S. Nutman, ed.

Graham, P.H. & Halliday, J. (1977). Inoculation and nitrogen -
fixation in the genus Phaseolus In Exploiting the Legume-Rhizo-
bium Symbiosis in Tropical Agriculture, University of Hawaii -
College of Tropical Agriculture Misc. Publ. 145: 313-334.

Graham, P. (1980). Characteristics of selected strains of Rhizobium phaseoli From the CIAT collection. p 29 y 30 en CIAT Rhizobium Collection.

Graham, P.H. (1981). Field Crops Research 4, 93-112.

Gresshoff, P.M., Skotnicki, M.L., Eadie, J.F. & Rolfe, B.G. - - (1977). Plant Science Letters 10, 299-304.

Gresshoff, P.M., Newton, S., Mohapatra, S.S., Scott, K.F., - - Howitt, S., Price, D.G., Bender, G.L., Shine, J. & Rolfe, B.G. - (1984) en Advances in Nitrogen Fixation Research pp 483-489. The Hague & Wageningen: Nijhoff & Pudoc.

Heichel, G.H., Barnes, D.K., Vance, C.P. (1981). Crop Physiology Abstracts 7, 102.

Heywood, V.H. (1971). The Leguminosae. A Systematic Purview. In - Chemotaxonomy of the Leguminosae: New York L Academic Press - - Harborne, J.B., Boulter, D. & Turner, B. pp1-29.

Higashi, S. (1967). Journal of General Applied Microbiology 13, 391-403.

Higashi, S. & Abe, M. (1980). Applied and Environmental Microbiology, 40, 1094-1099.

Hirsch, P.R. (1980). J. Gen Microbiol. 120, 403-412.

Hirsch, A.M., Long, S.R., Bang, M., Haskins, N. & Ausubel, F.M. (1982). Journal of Bacteriology 151, 411-419.

Hollis, A.B., Kloos, W.E., Elkan, G.H. (1981). Journal of General Microbiology 123, 215-222.

Hombrecher, G., Götz, R., Dibb, N.J., Downie, J.A., Johnston, A.W.B. & Brewin, N.J. (1984). Molecular General Genetics 194, 293-298.

Hooykaas, P.J.J., Brussel, A.A.N., den Dulk Ras, H., van Slogteren, G.M.S., & Schilperoort, R.A. (1981). Nature 291, 351-353.

Hooykaas, P.J.J., Snijdwint, F.G.M. & Schilperoort, R.A. (1982). Plasmid 8, 73-82.

Huguet, T., Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Lajudie, P., Jouanin, L., Batut, J., Boistard, P., Jullirt, J.S. & J. Déna rié. Studies on Rhizobium meliloti Plasmids and on Their Role in the Control of Nodule Formation and Nitrogen Fixation: The pSyn Megaplasms and the Other Large Plasmids en Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction. Springer Verlag. Berlin Heidelberg: A. Pühler, ed.

Jarvis, B.D.W. & Scott, K.F., Hughes, J.E., Djordjevic, M. Rolfe, B.G. & Shine, J. (1983). Can. J. Microbiol. 29, 200-209.

Johnston, A.W.B., Beynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V., Setchell, S.M., Hirsch, P.R. & Beringer, J.E. (1978). Nature 276, 634-636.

Kaluza, K., Fuhrmann, M., Hahn, M., Regensburger, B. & Hennecke, H. (1983). Journal of Bacteriology 155, 915-918.

Kallas, T., Rebiere, M.C., Rippka, R. & Tandeau de Marsac, N. (1983). Journal of Bacteriology 155, 427-431.

Keyser H.H., Munns, D.N. & Hohenberg, J.S. (1979). Soil - - Science Society of America Journal 43, 719-722.

Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu, T.S. & Weber, D.F. (1982). Science 215, 1631-1632.

Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C.E., Broughton, - W.J. & Banfalvi, Z. (1982). Molecular General Genetics 188, 433-439.

Kondorosi, A., Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Broughton, W.J., Pankhurst, C.E., Randhawa, G.S., Wong, C.H. & Schell, J. - (1983). Analysis of Symbiotic Nitrogen Fixation Genes - - Carried by the Rhizobium meliloti Megaplasmid en Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction Springer Verlag, Berlin Heidelberg: A. Pühler ed.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. (1984). Molecu- lar General Genetics 193, 445-452.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Slaska-Kiss, C. & Kondorosi, - A. (en prensa). En "UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology", New Series. Vol. 12.

Küntzel, H., Heidrich, M. & Piechulla, B. (1981). Nucleic - Acids Research 9, 1451-1461.

Kuy Kendall, L.D. & Elkan, G.H. (1976). Applied and Environ- mental Microbiology 32, 511-519.

Lange, R.T. (1961).. Journal of General Microbiology 26, - - 351-359.

Lie, T.A. (1978). Ann. Appl. Biol. 88, 462-465.

Long, S.R., Buikema, W. & Ausubel, F.M. (1982). Nature 298, 485-488.

Long, S.R., Jacobs, T., Beebe, D. & Egelhoff, T. (1983). -
Early Nodulation Genes of Rhizobium meliloti en Molecular -
Genetics of the Bacteria-Plant Interaction Springer Verlag,
Berlin Heidelberg: A. Pühler ed.

Long, S.R. (en prensa). Plant-Microbe Interaction. Eds. - -
Nester & Kosuge. Macmilian Publ.

Maier, R.J. & Brill, W.J. (1976). Journal of Bacteriology -
127, 763-769.

Marechal, R., Masherpa, J.M. & Stainer, F. (1978). Boissiera
28, 1-273.

Martin, P.G. & Jennings, A.C. (1983). Aust. J. Bot. 31,
395-409 & 411-419.

Martínez, E. & Palacios, R. (1984). En Advances in Nitrogen
Fixation Research, p. 60. The Hague & Wageningen: Nijhoff,
Junk & Pudoc.

Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.G., Brown, S.E. & Ausu--
bel, F.M. (1982). Journal of Bacteriology 149, 114-122.

Miranda, C.S. (1967). Origen de Phaseolus vulgaris L. - -
Agrociencia 1: 99-109.

Moffett, M.L. & Colwell, R.R. (1968). Journal of General -
Microbiology 51, 245-266.

Morales, V.M., Graham, P.H. & R. Cavallo (1973). Turrialba
23, 52-55.

Mortenson, L.E. & Thornelly, R.N.F. (1979). Annual Review -
of Biochemistry 48, 387-418.

- Morrison, N.A., Hau, C.Y., Trinick, M.J., Shine, J. & Rolfe, B. (1983). Journal of Bacteriology 153, 527-531.
- Munns, D.N. (1980). Mineral Nutrition and Nodulation, pp - 47-56.
- Munns, D.N. & Keyser, H.H. (1981). Soil Biol. Biochemistry 13, 115-118.
- National Academy of Sciences (1979). Tropical Legumes: Resources for the Future. Washington D.C. - -
- Nester, E.W. (1981). Annual Review of Microbiology 35, - - 531-565.
- Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis and differentiation in Biology of the Rhizobiaceae. Eds Giles & Atherly, pp - - 191-224 Academic Press N.Y.
- Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J. & Cevallos, M.A. (1984). Journal of Bacteriology 158, 148-155.
- Norris, D.O. (1967). Tropical Grasslands 1, 107-121.
- Núñez, E.R., Ferrara, C.R., Martínez, J.H., Cuautle, F.E. (1979). Final Report, Isotopic Techniques in Studies of - - Biological Nitrogen Fixation, México.
- Nuti, M.P., Ledebøer, A.M., Lepidi, A.A. & Schilperoort, R.A. (1977). Journal of General Microbiology 100, 241-248, -
- Nutman, P.S. & Ross, G.J.S. (1969). Rhizobium in the Soils of the Rothamsted and Woburn farms, Report Rothamsted Experimental Station 148-167, - -
- Paau, A.S., Leps, W.T. & Brill, W.J. (1981). Science 213, - 1513-1515.

Polhill, R.M., Raven, P.H., Stirton, C.H. (1918). Evolution and Systematics of the Leguminosae en Advances in Legume Systematics VI. Eds. R.M. Polhill & P.H. Raven.

Postgate, J. (1978) Nitrogen Fixation. Studies in Biology - 92, Great Britain. Camelot Press. E. Arnold Publishers. pp. 19-43.

Prakash, R.K., Shilperoort, R.A. & Nuti, M.P. (1981). - - J. Bact 145, 1129-1136.

Prakash, R.K. & Atherly, A.G. (1984). J. Bact 160, 785-787.

Preisler, R.S. and Thompson W.F. (1981). Journal of Molecular Evolution 17: 78-84 y 85-93.

Quinto, C., De la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G. & Palacios, R. (1982). Nature, London 299, 724-726.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., Girard, M.L., Calva, E. & Palacios, R. (1985). PNAS 82, 1170-1174.

Raven, P.H. & Polhill, R.M. (1981). Biogeography of the - - Leguminosae. En Advances in Legume Systematics VI. Eds: - - R.M. Polhill & P.H. Raven.

Rice, D., Mazur, B.J. & Haselkorn, R. (1982), Journal of Biological Chemistry 257, 13157-13163.

Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977), J. Mol. Biol. 113, 237-251.

Roberts, G., Leps, W.T., Silver, L.E. & Brill, W.J. (1980). Applied & Environmental Microbiology 39, 414-422.

Rolfe, B.G., Djordjevic, M., Scott, K.R., Hughes, J.E., - -
 Badenoch-Jones, J., Gresshoff, P.M., Cen, Y., Dudman, W.F.,
 Zurkowski, W. & Shine, J. (1981). Australian Academy of - -
Science, Canberra, Australia. pp. 142-145.

Rolfe, B.G., Djordjevic, M.A., Morrison, N.A., Plazinski, -
 J., Bender, G.L., Ridge, R., Zurkowski, W., Tellam, J.T., -
 Gresshoff, P.M. & Shine, J. (1983). Genetic Analysis of the
 Symbiotic Regions in Rhizobium trifolii and Rhizobium paras-
ponia en Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction.
 Springer Verlag Berlin Heidelberg: A. Pühler ed.

Ronson, C.W. & Scott, D.B. (1983). Identification, Broad -
 Host Range Mobilization and Mutagenesis of a Rhizobium - -
trifolii Sym: R68.45 Cointegrate Plasmid en Molecular - -
Genetics of the Bacteria-Plant Interaction Springer Verlag,
 Berlin Heidelberg: A. Pühler ed.

Rosenberg, C., Boistard, P., Dénarié, J. & Casse-Delbart, -
 F. (1981). Molecular General Genetics 194, 326-333.

Rovira, A.D. (1969). Botanical Reviews 35, 35-57.

Ruvkun, G.B. & Ausubel, F.M. (1980). PNAS 78, 229-233.

Scolnik, P.A. & Haselkorn, R. (1984). Nature, London 307, -
 289-292.

Scott, K.F., Rolfe, B.G. & Shine J. (1983). DNA 2, 149-155.

Scott, K.F., Rolfe, B.G. & Shine J. (1983a). DNA 2, 141-148.

Schaede, R. (1940). Planta 31, 1-21.

Schmidt, E. (1979). Annual Review of Microbiology 33,

Schwartz, R.M. & Dayhoff, M.O. (1978). Science 199, 395-403.

Segovia, L. (1985). Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica U.N.A.M.

Shine, J., Scott, K.F., Fellows, F.F., Djordjevic, M., - - Schofield, P., Watson, J.M. & Rolfe, B.G. (1983). Molecular Anatomy of the Symbiotic Region in *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium parasponia* en Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction Springer-Verlag Berlin Heidelberg: A. Pühler ed.

Silvester, W.B. (1976). En Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cap. 37, pp 521-538. Harpenden, Inglaterra P.S. - - Nutman Ed.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). Vector Plasmids for in-vivo and in vitro Manipulations of Gram-Negative Bacteria en Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction Springer Verlag, Berlin Heidelberg: A. Pühler ed.

Southern, E.M. (1975). J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Sprent, J.I. (1979). Functional Evolution in Some Papilionoid Root Nodules en Advances in Legume Systematics V.I - - Eds. R.M. Polhill & P.H. Raven.

Stowers, M.D. & Eaglesham, A.R.J. (1983). Journal of General Microbiology 129, 3651-3655.

Taylor, T.N. (1981). Paleobotany, An Introduction to Fossil Plant Biology Mc. Graw Hill Book Company.

Trinick, M.J. (1968). Experimental Agriculture 4, 243-253.

Trinick, M.J. (1973). Nature London 244, 459-460.

Trinick, M.J. (1980). Journal of Applied Bacteriology 49, -
39-53.

Truchet, G., Rosenberg, C. Vasse, J., Julliot, J.S., Camut, S. & Dénarié, J. (1984). Journal of Bacteriology 157, - -
134-142.

Van Brussel, A.A.N., Tak, T., Wetselaar, A., Pees, E. & - -
Wijffelman, C.A. (1982). Plant Science Letters 27, 315-317.

Vincent, J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of -
the Root-Nodule Bacteria, International Biological Programme Handbook, Vol. 15. Oxford & Einburgh: Blackwell Scientific Publications.

Wacek, T. & Brill, W.J. (1976). Crop Science 16, 519-522.

Weier, T.E., Stocking, C.R., Barbour, M.G. & Rost, T.L. - -
(1982). p. 171 en Botany. An Introduction to Plant Biology.
John Wiley & Sons.

Westermann, D.T., Kleinkopf, G.E., Porter, L.K. & Legett, -
G.E. (1981). Agronomy Journal 73, 660-664.

White, L.O. (1972). Journal of General Microbiology 72, - -
565-574.

Winarno, R. & Lie, T.A. (1979). Molecular General Genetics
194, 293-298.

Yun, A.C. & Szalay, A.A. (1984). PNAS 81, 7358-7362.

Zhou, J.C., Tchan, Y.T., Vicent, J.M. (1984). En Advances - in Nitrogen Fixation Research. p 275. The Hague & Wageningen: Nijhoff, Junk & Pudoc.

Zurkowski, W., Lorkiewicz, Z. (1978). Genet. Res., Camb. 32, 311-314.

Zurkowski, W. (1981). Molecular General Genetics 181, - - 522-524.