

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



José Casadesús Pursals

Estudios genéticos en Rhizobium meliloti

Tesis Doctoral

1979

R. 33.410

Dupl. R. 20834

4/102

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS GENÉTICOS EN *Rhizobium meliloti*
C. 15487015
613517533

ESTUDIOS GENÉTICOS EN *Rhizobium meliloti*.

José Casadesús Pursals

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1979

Tesis doctoral dirigida por el Dr. D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del C.S.I.C., de la Estación Experimental del Zaidín. Fue leída el día 31 de Enero de 1979, ante el tribunal formado por los profesores Montoya Gómez, Ramos Cormenzana, Piédrola Angulo, Olivares Pascual y Pretel Martínez. Obtuvo la calificación de "Sobresaliente cum laude".

ESTUDIOS GENETICOS EN *Rhizobium meliloti*

Memoria que presenta el licenciado en Ciencias Biológicas D. José Casadesús Pursals para aspirar al grado de Doctor.

Fdo.: José Casadesús Pursals

V° B°

El Director del trabajo

Fdo.: José Olivares Pascual
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

La Memoria que presentamos ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, gracias a una beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en las XIV Jornadas Luso-Españolas de Genética (Córdoba, 1978) y enviados para su publicación en *Molecular & General Genetics* y en *Applied and Environmental Microbiology*.

Al concluir la preparación de mi tesis doctoral, quiero hacer constar mi afecto y mi gratitud a aquellas personas que, a lo largo del tiempo y por diversas causas, han hecho posible que llegara este momento.

Me complace citar, ante todo, a mis padres. - Ellos han sabido favorecer sin la menor coacción el desarrollo de mis inquietudes. Sé, además, que en nombre de ellas han aceptado considerables sacrificios.

Debo citar también a un querido maestro, el Dr. Jordano Barea, de la Universidad de Córdoba, que influyó decisivamente en mi elección profesional. - Guardo un recuerdo entusiasta de las enseñanzas de don Diego Jordano y puedo decir sin rodeos que gracias a ellas comencé a pensar como biólogo.

Mi interés por la microbiología surgió a lo largo de los estudios de licenciatura, en las clases del Dr. Montoya Gómez, de la Facultad de Ciencias de Granada. Me complace reconocer que debo a don Enrique Montoya el descubrimiento, apasionante para mí, de la genética bacteriana.

He tenido la suerte de poder trabajar en genética a la hora de preparar mi doctorado. En otras palabras, los sueños han comenzado a convertirse en realidades. El principal responsable de ello es el Dr. Olivares Pascual. Obviamente, el discípulo es la persona menos indicada para hablar de su maestro; me conformaré con decir que, bajo la dirección de don José Olivares, la realidad no ha defraudado, en absoluto, a los sueños.

Añadiré que la preparación de esta memoria, desarrollada desde el otoño de 1975, ha sido extremadamente agradable. Por fortuna, mis compañeros del Departamento de Microbiología constituyen, además de un estimulante grupo de trabajo, un reducto de amistad.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a Manuel Martínez, que ha dibujado las gráficas y figuras de esta memoria, y a Mercedes Gómez-Moreno, que la ha mecanografiado con esmero.

Granada, 1979.

INDICE

	Pág.
RESUMEN Y OBJETO DEL TRABAJO	12
INTRODUCCION	15
Consideraciones generales	16
Genética de <i>Rhizobium</i> : aspectos generales	19
Taxonomía	19
Replicación	20
Mutaciones	20
Plásmidos	21
Interacciones entre <i>Rhizobium</i> y sus fagos	23
Bacteriocinogenia	26
Genética de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	27
Genética de <i>Rhizobium</i> : caracteres simbióticos	29
Conceptos y nomenclatura	29
Especificidad de huésped	30
Infectividad	31
Mutaciones que afectan a la infectividad	31
Control por plásmidos	32
Efectividad	34
Mutaciones que alteran la efectividad	34
Control por plásmidos	38
Genética de la fijación de nitrógeno	39
Regulación de la fijación de nitrógeno	43
Modelo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43

	Pág.
Regulación de la fijación en <i>Rhizobium</i>	46
Transferencia genética en <i>Rhizobium</i>	48
Transformación	48
Transfección	54
Conjugación	54
Transducción	60
Origen y evolución de los sistemas fijadores de ni- trógeno	62
Filogenia de la nitrogenasa	62
Origen y evolución de la simbiosis <i>Rhizobium</i> - leguminosa	64
Perspectivas de la investigación	66
MATERIAL Y METODOS	69
Microorganismos	70
Plásmidos	70
Bacteriófagos	71
Planta	71
Medios de cultivo	71
Antibióticos	75
Solución nutritiva	75
Tampón tris-maleico	76
Obtención de mutantes auxotróficos de <i>R.meliloti</i> . por tratamiento con nitrosoguanidina	77
Aislamiento, purificación y caracterización de los mutantes auxotróficos	78
Selección de mutantes resistentes a antibióticos .	78

	Pág.
Enriquecimiento y titulación de las suspensiones de los fagos de <i>R. meliloti</i> y <i>E. coli</i> que han sido usados	79
Inducción de las estirpes lisogénicas de <i>R. meliloti</i> con mitomicina C	80
Transferencia del factor R68.45 desde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>E. coli</i>	81
Transferencia del factor R68.45 desde <i>E. coli</i> a <i>R. meliloti</i>	82
Transferencia del factor R68.45 entre razas de <i>R. meliloti</i>	83
Transferencia de marcadores cromosómicos mediada por el factor R68.45 en <i>R. meliloti</i>	83
Análisis de los cruces intraespecíficos de <i>R. meliloti</i> mediados por el factor R68.45	84
Construcción del mapa de ligamiento de <i>R. meliloti</i> 4c	84
Transducción generalizada por el fago DF2.1	84
Estudio de la influencia de la multiplicidad de infección sobre la frecuencia de transducción ..	85
Estudio de las propiedades de los transductantes.	85
Análisis cotransduccional	86
Preparación de plántulas asépticas	86
Cultivo hidropónico de plántulas asépticas de alfalfa	86
Medida del grado de infectividad de diferentes razas de <i>R. meliloti</i>	87

	Pág.
Medida de la efectividad de diferentes razas de <i>R. meliloti</i>	88
Reaislamiento de razas de <i>R. meliloti</i> a partir de nódulos	89
Viabilidad de las razas de <i>R. meliloti</i> en la solución nutritiva	89
Curvas de crecimiento de diferentes razas de <i>R. meliloti</i>	90
Obtención de polisacáridos extracelulares de <i>R. meliloti</i>	90
Utilización de los polisacáridos en los ensayos de infectividad	90
RESULTADOS Y DISCUSION	91
Experiencias de conjugación y transducción : Construcción del mapa circular de ligamiento de <i>R. meliloti</i> 4c	92
Transferencia del factor R68.45 de <i>P. aeruginosa</i> a <i>E. coli</i>	92
Transferencia del factor R68.45 de <i>E. coli</i> a <i>R. meliloti</i>	92
Estabilidad del factor R68.45 dentro de <i>R. meliloti</i> 4c	94
Transferencia intraespecífica del factor R68.45 y movilización de cromosoma en <i>R. meliloti</i> 4c	95
Análisis de los cruces intraespecíficos de <i>R. meliloti</i> 4c mediados por el factor R68.45..	95
Alcance de la transferencia cromosómica	97

	Pág.
Alcance de la recombinación y de la haploidización	99
Características de la transferencia cromosómica	100
Construcción del mapa cromosómico de <u>li</u> gamiento de <i>R. meliloti</i> 4c por conjugación mediada por el factor R68.45	104
Transducción de marcadores de <i>R. meliloti</i> 4c por el fago DF2	108
Propiedades de los transductantes	110
Análisis cotransduccional	114
Corrección del mapa de ligamiento y estimación de la longitud real de los exogenotes	116
Significación de los resultados: consideraciones finales	118
Estudios de genética de las características simbióticas de <i>R. meliloti</i>	123
Estudio cuantitativo de la infectividad	127
Mutaciones que alteran el grado de infectividad	134
Importancia del plásmido PG en relación con la infectividad	138
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFIA	143

RESUMEN Y OBJETO DEL TRABAJO

Las investigaciones sobre fijación biológica de nitrógeno, especialmente en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, constituyen ya una línea clásica de trabajo en el Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín. Dentro de ella, el trabajo que se describe en la presente memoria ha estado dedicado a la puesta a punto de una metodología adecuada para el análisis genético de *R. meliloti*, con vistas a los estudios de localización, expresión, regulación, transferencia y manipulación de genes simbióticos.

La falta de plásmidos conjugativos autóctonos, que podrían ser útiles para el análisis genético de *Rhizobium* spp., ha podido ser suplida por el uso de plásmidos promiscuos, como los factores R del grupo de incompatibilidad P1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Uno de ellos, el factor R68.45 (Haas y Holloway, --- 1976), fue el elegido para la construcción de un mapa cromosómico de ligamiento de *R. meliloti*.

Los mapas construidos a partir de las experiencias de conjugación mediada por los factores R P1 son relativamente imprecisos y se ha sugerido el uso de la ecuación de Wu para su corrección (Kondorosi *et al.* 1977). Sin embargo, la adaptación de la fórmula de Wu al mapeo conjugacional presenta problemas teóricos, por lo que ha sido necesario desarrollar nuevos métodos de corrección.

Con este fin, se ha estudiado la transducción generalizada - por el fago DF2.1 y se ha llevado a cabo el análisis cotransduccional de varias regiones del cromosoma de *R. meliloti*.

Simultáneamente, una extensa colección de mutantes, obtenidos en nuestro laboratorio por medio de diferentes técnicas, -- han sido estudiados con vistas a la detección de fenotipos simbióticos alterados. Aun admitiendo que los fenotipos simbióti--

cos Inf y Eff son conceptos amplios y que, en consecuencia, pueden ser el resultado de la cooperación de un cierto número de genes, - sólo deben considerarse genes simbióticos aquellos cuya mutación - determine un cambio fenotípico de tipo "todo o nada".

En la colección de razas estudiadas no se ha detectado ninguna mutación que pudiera corresponder a un gen simbiótico. Por ello, - el mapa cromosómico incluye únicamente marcadores nutritivos y de resistencia a antibióticos.

Aunque se describen algunas mutaciones que afectan inespecíficamente al carácter Eff^+ de *R. meliloti*, la mayor parte de los - estudios de genética de las propiedades simbióticas se han dedicado a la infectividad, utilizando una técnica cuantitativa más --- simple que la tradicional de competición entre razas. Se describe el efecto que la auxotrofia posee sobre el grado de infectividad de *R. meliloti* y se discute la influencia de otras características genéticas.

INTRODUCCION

CONSIDERACIONES GENERALES

Una de las teorías más conocidas del historiador Arnold Toynbee es la que se conoce con el nombre de "el reto y la respuesta". Según Toynbee, la evolución de las sociedades humanas es consecuencia de sucesivos retos históricos, cada uno de los cuales ha exigido una respuesta ineludible. En la historia reciente de la tecnología agraria existe un ejemplo que se adapta perfectamente al modelo de Toynbee. A principios de siglo, los depósitos chilenos de nitrato comenzaron a dar señales de agotamiento. Como consecuencia, fue necesario desarrollar la fabricación industrial de abonos nitrogenados, mediante el proceso Haber-Bosch. Desde 1913 hasta hoy, la producción de fertilizantes basada en el proceso Haber-Bosch se ha incrementado continuamente. Según un cálculo de Sweeney, previo a la depresión económica iniciada en 1974, el gasto mundial en abonos nitrogenados podría fijarse en unos 10.000 millones de dólares anuales.

El progresivo aumento del coste de los combustibles fósiles, que son la fuente de hidrógeno para el proceso Haber-Bosch, repercute seriamente en la economía agrícola. Y es previsible que, a medida que el petróleo y el gas natural vayan agotándose, muchas explotaciones agrarias dejen de ser rentables.

La trascendencia histórica de estos hechos es agravada por las circunstancias en que la humanidad debe afrontarlos. La superpoblación del planeta y la amenaza de deterioro ecológico son retos estrechamente ligados al problema agrícola. Existe una necesidad imperiosa de aumentar la productividad, pero el uso de abonos químicos, además de caro, puede resultar peligroso. La aplicación exhaustiva de fertilizantes nitrogenados (en el caso de que fuera posible, gracias a la utilización de nuevas fuentes de energía) significaría un grave peligro ecológico, derivado de la eutrofización de las aguas y el aumento de nitratos en el agua potable.

En estas circunstancias, la creciente atención dedicada a los procesos biológicos fijadores de nitrógeno se halla más que justificada. Dicha atención ha crecido de forma espectacular en la última década y es previsible que crezca aún más, dada su trascendencia socio-económica.

Los procesos biológicos son, en realidad, los contribuyentes mayoritarios al ciclo del nitrógeno en la biosfera; su aportación puede evaluarse en más de un 90% del nitrógeno fijado (Postgate, 1974).

La lista de organismos fijadores de nitrógeno se halla restringida a Procariotas: bacterias y algas verde-azuladas. En los últimos años, gracias al empleo de la técnica de reducción de acetileno (Koch y Evans, 1966) la lista ha crecido de forma espectacular, e incluye a representantes de grupos taxonómicos muy variados.

Sin embargo, la mayor parte de los microorganismos fijadores carecen, hoy por hoy, de interés agrícola. Incluso los clásicos fijadores libres, como *Azotobacter*, aportan a la producción vegetal una cantidad irrelevante de nitrógeno. Desde el punto de vista de la productividad agraria, los fijadores verdaderamente importantes son aquellos que llevan a cabo su actividad en asociación con plantas superiores. El prototipo de todos ellos es, sin duda, *Rhizobium*.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa representa el mayor grado de especialización en la fijación y es el sistema más eficiente en términos de nitrógeno fijado; así lo avalan tanto la práctica ancestral de la rotación de cultivos, como los modernos cálculos de rendimiento de cosecha. De ahí que la fijación simbiótica haya sido un objetivo primordial en todos los programas de investigación para el desarrollo.

Ahora bien, por su complejidad, las simbiosis fijadoras son los sistemas menos asequibles al análisis bioquímico y genético. - Ello ha determinado que, en muchos casos, la investigación haya tenido que ser desviada hacia sistemas más simples, como son los fijadores libres. Pero el estudio de la fijación libre no se ha limitado a aportar datos que pudieran extrapolarse a la simbiosis, sino que ha abierto nuevos campos de aplicación. Como consecuencia, la potenciación de las simbiosis ya no es el único objetivo propuesto ni siquiera el más ambicioso. Todo ello se discutirá más adelante.

Obviamente, el caracter multidisciplinario de las investigaciones sobre fijación de nitrógeno se ha acentuado como consecuencia del propio progreso. Las páginas que siguen se refieren únicamente a aspectos genéticos; enfoques correspondientes a otras disciplinas pueden hallarse en varios libros recientes: los Proceedings correspondientes al Symposium sobre fijación de nitrógeno de Pullman (1974) y al de Salamanca (1976), los volúmenes 6 y 7 del International Biological Programme (editados respectivamente por Stewart y Nutman, 1976) y el compendio "A Treatise on Dinitrogen Fixation" (editado por Hardy y Silver, 1977).

GENETICA DE *Rhizobium*: ASPECTOS GENERALES

Taxonomía.

Se incluyen dentro del género *Rhizobium* todas las especies bacterianas capaces de formar asociaciones simbióticas con las leguminosas. Los estudios de taxonomía numérica y de composición de bases del ADN han mostrado la conveniencia de revisar la clasificación tradicional.

La propuesta de confeccionar dos géneros con las actuales especies de *Rhizobium*, basándose en los resultados proporcionados por el análisis adansoniano (Graham, 1964) ha sido apoyada por los estudios de composición de bases del ADN (de Ley y Rassel, 1965) y el análisis por computadora ('t Mannelje, 1967). Sin embargo, apenas ha encontrado eco.

La principal causa del rechazo de estas innovaciones radica en que proponen la inclusión de dos especies de *Agrobacterium*, *A. radiobacter* y *A. tumefaciens*, dentro de uno de los nuevos géneros constituidos a partir de *Rhizobium*. Norris (1967) considera más lógico seguir agrupando en un solo género a las especies simbióticas de las leguminosas. En la actualidad, los mismos autores que han propuesto la revisión taxonómica muestran un cierto pesimismo (Graham, 1976): hoy por hoy, el hecho intuitivo de la simbiosis es más poderoso que la racionalización de los datos.

A nivel de especies, la taxonomía actual del género *Rhizobium* se basa en el supuesto tradicional de que cada especie sólo puede inducir la formación de nódulos en su leguminosa específica (Fred *et al.* 1932). Los defectos de esta clasificación basada en la infectividad selectiva son notables. En primer lugar, porque la promiscuidad simbiótica es un hecho frecuente, hasta el punto de que sólo *Rhizobium meliloti* cumple estrictamente el criterio original de nodulación específica (Graham, 1976). En segundo lugar, por

que han sido descritas hasta 14.000 especies de leguminosas, de las que sólo han sido estudiadas un 8-10% desde el punto de vista de la nodulación (Graham, 1976). Ello sin contar que *Rhizobium* -- puede formar asociaciones simbióticas con no leguminosas (Trinick, 1973; Akkermans *et al.* 1978).

El contenido del ADN en guanina + citosina varía desde 59.0 a 63.5 en el grupo de *Rhizobium* de crecimiento rápido (*R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. meliloti* y *R. phaseoli*) y desde 59.0 a 65.5 en el grupo de lento crecimiento (*R. japonicum*, *R. lupini*, *Rhizobium* spp. "cowpea"). Las menores desviaciones se encuentran en *R. meliloti*: 62.0-63.5 (de Ley, 1968). Los datos de la taxonomía numérica coinciden en señalar que *Rhizobium meliloti* es la única especie actual que debería ser conservada.

Replicación.

La replicación del cromosoma de *Rhizobium* spp. ha sido muy poco estudiada. Al-Ani (1972) construyó un mapa de replicación de baja resolución en *R. trifolii*. Recientemente, se ha demostrado que la replicación del cromosoma de *R. trifolii* es bidireccional (Zurkowski y Lorkiewicz, 1977).

Mutaciones

La variabilidad genética de *Rhizobium* ha sido ampliamente estudiada, con diversos objetivos. Uno de los más frecuentes ha sido establecer los principios de selección de razas de *Rhizobium* para la producción de inóculos industriales. Una serie de revisiones actuales al respecto puede hallarse en el libro "Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants" (P.S. Nutman, editor; 1976). Como los caracteres simbióticos de *Rhizobium* no son seleccionables en placa, la Genética molecular no ha podido aportar nuevas técnicas en este campo. Los trabajos de selección de razas en razón de su efectividad, com-

petividad, capacidad de supervivencia o de multiplicación en el suelo adolecen de las limitaciones de los métodos genéticos clásicos. El tamaño reducido de las muestras, especialmente si se requiere un ensayo en planta, explica que muchos de los resultados obtenidos sean conflictivos (Véase Schwinghamer, 1974).

En el laboratorio, la selección de mutantes por los métodos genéticos usuales no ofrece ningún problema. Para el estudio de las propiedades simbióticas se suele recurrir a técnicas indirectas, examinando *a posteriori* el comportamiento simbiótico de mutantes previamente caracterizados *in vitro* (véase Dénarié *et al.* 1976; Beringer *et al.* 1977).

También es necesario trabajar con mutantes en los estudios de tipo ecológico. La determinación de las mutaciones más adecuadas para el seguimiento de *Rhizobium* en el suelo ha sido un frecuente objeto de controversia. Es evidente que deben elegirse marcadores que no posean efectos pleotrópicos sobre la eficiencia simbiótica. En los trabajos más recientes (Schwinghamer, 1973; Amarger, 1975) se tiende a usar marcadores de resistencia a antibióticos.

Plásmidos.

Como en otras muchas bacterias, en *Rhizobium* spp. la existencia de plásmidos es un hecho frecuente, si no general. Algunas referencias sólo son indirectas: la existencia de un plásmido se deduce de la pérdida de determinados caracteres fenotípicos tras el tratamiento con naranja de acridina o agentes similares (Higashi, 1967; Parijskaia, 1973). Otros trabajos, en cambio, han aportado pruebas biofísicas (centrifugación en gradiente, microscopía electrónica, etc). Estos trabajos se relacionan en la Tabla 1.

Tabla 1

Plásmidos de *Rhizobium* spp.

Especie	Fuente	Peso molecular (x10 ⁶ dalton)
<i>R. japonicum</i>	Luyindula <i>et al.</i> 1975	No descrito
<i>R. sp. "vigna"</i>	Tshitenge <i>et al.</i> 1975	>26
<i>R. trifolii</i>	ibid.	>26
<i>R. japonicum</i>	Klein 1975	No descrito
<i>R. trifolii</i>	Zurkowski & Lorkiewicz 1976	64
<i>R. trifolii</i>	Duncan <i>et al.</i> 1976	28
<i>R. meliloti</i>	Hórvath <i>et al.</i> 1977	No descrito
<i>R. leguminosarum</i>	Nuti <i>et al.</i> 1977	130
<i>R. leguminosarum</i>	ibid.	70-100
<i>R. trifolii</i>	ibid.	350-400
<i>R. trifolii</i>	ibid.	140
<i>R. japonicum</i>	ibid.	160
<i>R. sp. "dolichos"</i>	ibid.	110
<i>R. meliloti</i>	Palomares <i>et al.</i> 1978	5.9
<i>R. meliloti</i>	Bechet y Guillaume, 1978	No descrito

Algunos de estos plásmidos y otros no demostrados físicamente han sido relacionados con las propiedades simbióticas de *Rhizobium*, como se mencionará más adelante.

No se ha descrito la existencia de factores sexuales en *Rhizobium*. En general, los plásmidos estudiados no han resultado auto transmisibles. La única excepción está constituida por el pequeño plásmido de *R. meliloti* detectado por Palomares y colaboradores; a pesar de que su información genética debe reducirse a 6-10 genes, resulta transmisible a razas curadas *in vitro*, con una frecuencia comparable a la del Factor F de *E. coli* (Bedmar, 1978).

Por lo que se refiere a factores R, disponemos únicamente - de los datos obtenidos por Cole y Elkan (1973). Dichos autores aislaron una raza de *R. japonicum* que mostraba resistencia múltiple - (penicilina G, neomicina y cloramfenicol). El tratamiento con naranja de acridina producía la pérdida de la resistencia múltiple. El factor R responsable pudo ser transferido desde *R. japonicum* a *A. tumefaciens*. No se ha descrito si este factor puede promover transferencia cromosómica como los factores R de Enterobacteriáceas (Watanabe, 1963; Meynell y Datta, 1966).

La pobreza de *Rhizobium* en plásmidos autotransmisibles ha - podido ser compensada por la introducción de plásmidos exógenos, - con vistas al análisis genético. Como otras muchas bacterias gramnegativas (Richmond y Wiedeman, 1974), *Rhizobium* muestra una amplia tolerancia a los plásmidos ajenos y en algunos casos el grado de expresión de los mismos no parece diferir del que alcanzan en el huésped original. Así ocurre con algunos factores R procedentes de *Pseudomonas aeruginosa*, cuya utilidad para el análisis genético de *Rhizobium* se describe más adelante.

Interacciones entre *Rhizobium* y sus fagos.

El aislamiento de bacteriófagos de *Rhizobium* spp. a partir de extractos de suelo rizosférico no ofrece dificultad alguna (véase Vicent, 1970). Desde las primeras experiencias en este sentido (Vandecaveye y Katznelson, 1936) hasta hoy, se han aislado bacteriófagos específicos de todos los grupos de inoculación de *Rhizobium*.

Hasta ahora, los bacteriófagos más estudiados han sido los de *Rhizobium meliloti*. Por las colecciones de microfotografías de que disponemos (Krsmanovic-Simic y Werquin, 1973; E. Corral, comunicación personal) resulta evidente que existe una gran variedad - de morfologías, con predominio de los bacteriófagos de tipo complejo.

Un estudio exhaustivo de carácter químico y genético ha sido llevado a cabo por Sik y Orosz (1971) en el fago 16-3 de *R. meliloti*. Se trata de un fago ADN, y la composición de bases del ácido nucleico es muy parecida a la de la bacteria. El peso molecular del ADN es de $3-4 \times 10^6$ dalton. Los mismos autores han obtenido un mapa genético del fago, localizando en él mismo varios cistrones - de expresión temprana, genes reguladores y algunos genes de expresión tardía (como los correspondientes a la cola y a la síntesis - de lisozima).

Con respecto a la naturaleza de la relación bacteria/fago, se han descrito todo tipo de bacteriófagos, desde muy virulentos a muy moderados. También es frecuente que el comportamiento de un -- bacteriófago se halle sujeto a las condiciones ambientales, especialmente a la temperatura. Sik y Orosz (1971) han descrito el aislamiento de mutantes termosensibles y termoinducibles.

La lisogenia ha sido descrita prácticamente en todas las especies de *Rhizobium*: *R. trifolii* (Marshall, 1956; Takahshi y Quadding, 1961; Salmond y Primrose, 1976), *R. leguminosarum* (Schwinghamer y Reinhardt, 1963), *R. meliloti* (Kowalski, 1966) y *R. lupini* (Heumann et al. 1974). En general, todas las razas lisogénicas de *Rhizobium*, incluidas aquellas en las que es difícil demostrar la liberación espontánea de viriones, son fácilmente inducibles mediante el tratamiento con mitomicina C o la exposición a la luz ultravioleta. De esta forma se ha podido establecer que, en *R. meliloti*, al menos un 70% de las razas que se aíslan del suelo son lisogénicas (Kowalski, 1966). Esta proporción debe considerarse como la mínima, puesto que la detección del fago depende de la disponibilidad de una raza sensible. También debe tenerse en cuenta la posibilidad de que existan sistemas lisogénicos defectivos, cuya puesta en evidencia exige una metodología más compleja que la usada por Kowalski.

Szende (1971) ha demostrado que el profago 16-3 es capaz de

integrarse en el cromosoma de *R. meliloti*. Recientemente, Sváb *et al.* (1978) han precisado que el punto de integración de dicho profago se halla entre los marcadores *cys-45* y *met-5* del mapa de Kondrosi *et al.* (1977).

Aparte de su utilidad para el análisis genético, que será considerada posteriormente, los bacteriófagos de *Rhizobium* pueden servir para la tipificación de razas (Staniewski, 1970). Es más, puede ser necesario recurrir a los fagos para clasificar como *Rhizobium* los mutantes Inf⁻. Ahora bien, cabe la posibilidad de que determinadas mutaciones que afectan a las estructuras bacterianas superficiales pudieran alterar simultáneamente la infectividad y la sensibilidad a los fagos. Así ocurre en *R. trifolii* (Kleczkowska, 1950, 1965). En *R. meliloti*, las razas "curadas", que se muestran resistentes a toda una serie de fagos plásmido-dependientes (Corral *et al.* 1978) son menos infectivas que la raza silvestre sensible a los fagos (Olivares *et al.* sometido a publicación). Por otra parte, Staniewski *et al.* (1973) han observado que las razas de *R. trifolii* que llevan mutaciones que afectan al antígeno somático pueden sufrir alteraciones en su fagotipo. Lo mismo ocurre cuando las alteraciones del antígeno somático son debidas a la conversión lisogénica (Barnet y Vincent, 1970). En cambio, no existe ningún dato -- que pudiera indicar que la conversión lisogénica afecte a las características simbióticas.

Finalmente, se debe mencionar que en *R. leguminosarum* y *R. trifolii* se han descrito fenómenos de restricción y modificación controlada por el huésped (Schwingamer, 1964, 1966). Se conoce -- con cierto detalle la modificación fenotípica del ADN de dos fagos moderados de *R. leguminosarum* y el reconocimiento de dicho ADN modificado por parte de diferentes razas restrictoras.

Bacteriocinogenia

La literatura sobre producción de bacteriocinas por *Rhizobium* no es muy abundante, a pesar de que los primeros trabajos en este campo fueron publicados hace poco más de una década (Roslycky, 1967). Algunas de las bacteriocinas descritas son probablemente co las de fago (Lotz y Mayer, 1972) o partículas de fago incompletas (Schwinghamer *et al.* 1973). En *R. trifolii* se han descrito también bacteriocinas de bajo peso molecular, de tipo no fágico (Schwinghamer, 1975).

No se tienen suficientes datos genéticos sobre la bacteriocinogenia de *Rhizobium*. *A priori*, la producción de rhizobiocinas - de tipo "phagelike" debe ser atribuída a profagos defectivos. Sería interesante determinar si la síntesis de bacteriocinas del segundo tipo está codificada en plásmidos, como ocurre en otras bacterias (véase Novick, 1969).

GENETICA DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Por su complejidad, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es un sistema biológico de difícil acceso, particularmente a nivel molecular. El nódulo fijador de nitrógeno es producto de la interacción de los dos genomas implicados y, aunque conocemos algunas manifestaciones de dicha interacción, estamos muy lejos de poder elaborar un modelo global.

Ya se ha citado la imposibilidad de seleccionar en placa los caracteres simbióticos de *Rhizobium*. Es obvio que la genética de la planta se halla sometida al mismo tipo de limitaciones estadísticas (y en este caso es imposible recurrir al método indirecto).

En una revisión de Holl y LaRue (1974) se hace una estimación del número de genes de la planta supuestamente implicados en la fijación; evidentemente, los datos proceden del análisis de poblaciones. Este tipo de trabajos, de indudable interés con vistas a la mejora vegetal, contribuyen muy poco a la comprensión de los hechos básicos de la simbiosis.

Es posible que los estudios de manipulación genética de plantas superiores, actualmente en desarrollo, puedan poner a punto técnicas analíticas más fructíferas (véase Ledoux, 1975). Ya existen precedentes; el establecimiento de simbiosis entre *Rhizobium* y cultivos de tejidos de leguminosas (Holsten *et al.* 1971) y de otras plantas (Child, 1975; Scowcroft y Gibson, 1975).

El ejemplo clásico de la cooperación de los dos simbioses es la síntesis de la leghemoglobina. De hecho, es la única interacción *Rhizobium*-planta bien conocida. Se han obtenido diferentes evidencias de que la información genética para la síntesis de la globina se halla codificada en la planta, mientras que el correspondiente *Rhizobium* aporta el grupo hemo (Cutting y Schulman, 1969, 1971; Verma *et al.*, 1974; Sidloi-Lumbroso *et al.* 1978). Por el con

trario, la hipótesis tradicional de que la planta podría cooperar en la síntesis de nitrogenasa se derrumbó en 1975, como consecuencia del descubrimiento de la fijación libre por *Rhizobium* (Pagan *et al.* 1975; Kurz y LaRue, 1975; McComb *et al.* 1975).

El resto de las interacciones son poco o mal conocidas y en muchos casos ha sido necesario aceptar como hipótesis de trabajo los modelos obtenidos en sistemas fijadores más simples.

GENETICA DE *Rhizobium*: CARACTERES SIMBIOTICOS

Conceptos y nomenclatura.

Tradicionalmente, las propiedades simbióticas de *Rhizobium* han sido clasificadas en tres grandes fenotipos: especificidad de huésped (Hsp) o capacidad de nodular un huésped específico, infectividad (Inf) o capacidad de inducir la formación de nódulos y efectividad (Eff) o capacidad de fijar nitrógeno en el nódulo.

Esta clasificación adolece de una cierta confusión entre los caracteres Hsp e Inf y algunos autores han renunciado a distinguirlos (véase Dunican y Cannon, 1971). Sin embargo, los últimos descubrimientos sobre la especificidad, que serán citados más adelante, permite introducir un nuevo enfoque en la cuestión. Concretamente, el fenotipo Hsp podría englobar todas las características relativas a la etapa de preinfección, en la que tienen lugar los fenómenos de reconocimiento y de anclaje de la bacteria a los receptores estereoespecíficos de la superficie radical. Utilizaremos, pues, el término Hsp con este criterio y reservaremos el término ambiguo Hsp/Inf para aquellos casos en que los autores -- han considerado globalmente ambos caracteres y/o cuando las experiencias realizadas no permiten efectuar la distinción.

Con respecto al fenotipo Eff, debemos precisar que los genes que controlan la capacidad fijadora de nitrógeno pueden ser de tres tipos (Dénarié y Truchet, 1974):

a) Genes que controlan tanto el carácter Eff como otras características definidas *in vitro* (*leu*, *ade*, *nar*).

b) Genes que controlan el carácter Eff y no están relacionados, al menos aparentemente, con ninguna característica definida *in vitro*: genes *eff*.

c) Genes que codifican la síntesis de la nitrogenasa o ge-

nes *ni*₆. Son, por tanto, un subgrupo de genes *e*₆₆.

De acuerdo con estas distinciones, utilizaremos únicamente el término *e*₆₆ para designar a los genes del segundo grupo y, de forma genérica cuando, aun pudiendo tratarse del operón *ni*₆, no existan evidencias al respecto.

Especificidad de huésped.

Ya hemos mencionado que la supuesta especificidad de *Rhizobium*, en la que se basa la taxonomía a nivel de especies, carece de un rigor absoluto. Sin embargo, y con todas las reservas necesarias, se puede definir el caracter Hsp como el conjunto de características que permiten a una determinada especie de *Rhizobium* entrar en asociación con un número limitado de eventuales huéspedes.

La naturaleza de los mecanismos responsables de la especificidad ha comenzado a ser desvelada recientemente. La base del reconocimiento estereoespecífico parece consistir en una interacción de las lectinas de la raíz y el antígeno O del lipopolisacárido bacteriano (Wolpert y Albersheim, 1976). Ha sido aislada y purificada una lectina superficial de la raíz de trébol, la "Trifolina" (Dazzo y Hubbel, 1975; Dazzo *et al.* 1978). La capacidad de aglutinar con la trifolina ha sido transferida de *R. trifolii* a *Azotobacter vinelandii*, por transformación (Bishop *et al.* 1977). También han sido transferidos de *R. japonicum* a *A. vinelandii* los genes -- que codifican el antígeno O, antígeno que no existe en las razas de *R. japonicum* incapaces de producir nodulación (Maier *et al.* 1978).

Estas experiencias permiten, a nuestro juicio, distinguir claramente el caracter Hsp⁺ (aglutinación específica) del caracter Inf⁺ (Formación de nódulos). Es obvio que en las experiencias citadas fue transferido a *Azotobacter* el primero, pero no el segundo.

El descubrimiento de los genes *hsp* abre al fin posibilidades de estudio de las bases genéticas de la especificidad. No hay por el momento, datos acerca de la localización, funcionamiento y expresión de dichos genes.

Infectividad.

La capacidad de *Rhizobium* spp. para invadir el córtex radical del huésped apropiado e inducir la formación de nódulos ha sido objeto de numerosos estudios en las pasadas décadas. Sin embargo, no existe ningún modelo que explique satisfactoriamente el proceso. El único modelo global sigue siendo el de Nutman (1965), y los trabajos posteriores que lo han aceptado como hipótesis de trabajo han proporcionado resultados contradictorios. Un interesante análisis de la validez actual del modelo de Nutman se encuentra en la revisión de Olivares (1976).

Mutaciones que afectan a la infectividad.

A excepción de *Rhizobium meliloti*, la pérdida espontánea del carácter Inf^+ es muy frecuente. Determinadas especies y razas de *Rhizobium* mutan a Inf^- como consecuencia del simple mantenimiento en condiciones asimbióticas, es decir, en medios de cultivo (cfr. Schwingamer, 1969). Ello debe interpretarse en el sentido de que los genotipos más ventajosos en los medios de cultivo no coinciden con los más eficientes simbióticamente.

Asimismo, excepto en *R. meliloti*, resulta relativamente fácil aislar fenotipos Inf^- por medio del tratamiento con agentes mutagénicos (Maier y Brill, 1976). También se han aislado mutantes Hsp/ Inf de tipo promiscuo (Inshenetskii y Parijskaya, 1973).

De todos modos, la mayor parte de los trabajos en los que se da cuenta de mutaciones que afectan al caracter Inf han utilizado el método indirecto ya citado o "asociación *in vitro-in vivo*", según la denominación de Dénarié *et al.* (1976).

Históricamente, el primer cambio fenotípico *in vitro* asociado con elteración de las propiedades simbióticas fue descrito por Kleczkowska (1950) en *R. trifolii*; más de un 50% de los mutantes resistentes a fagos resultaban Inf⁻. Un trabajo posterior abunda en los mismos resultados (Kleczkowska, 1965).

También se han realizado numerosos estudios con mutantes resistentes a antibióticos. Solamente las razas Str^r de *R. trifolii* son con toda seguridad Inf⁻ (Zelazna-Kowalska, 1971; Zelazna-Kowalska y Lorkiewicz, 1971). La mutación acarrea otros efectos pleotrópicos, tales como modificaciones de la morfología de la colonia.

Las mutaciones de resistencia a inhibidores metabólicos, -- principalmente aminoácidos y análogos de aminoácidos, han sido extensamente estudiadas por Schwingamer (1968). Casi un 50% de estos mutantes muestran alteraciones simbióticas, pero la mutación Eff⁻ es más frecuente que Inf⁻.

Finalmente, debemos reseñar que en *R. trifolii* se ha descrito la pérdida de la infectividad como consecuencia de la auxotrofia (Lorkiewicz *et al.* 1971). Dos razas Met⁻, tres Cys⁻, una His⁻, una Ser⁻ y cuatro Ade⁻ resultaron Inf⁻. En cambio, en *R. meliloti* no se ha hallado relación entre la auxotrofia y la pérdida de la infectividad (Scherrer y Dénarié, 1971; Malek, 1974).

Control por plásmidos.

La inestabilidad del caracter Inf⁺ en algunas razas, correlacionada con la frecuente aparición de fenotipos Inf⁻ después del -

tratamiento con agentes eliminadores de plásmidos, ha conducido a diversos autores a proponer que los genes *inf* de *Rhizobium* spp. podrían estar localizados en un plásmido (Higashi, 1967; Dunican y Cannon, 1971).

En las experiencias de Higashi, el carácter Hsp/Inf, transmisible por conjugación de *R. trifolii* a *R. phaseoli*, podía ser curado mediante el tratamiento con naranja de acridina. Zurkowski *et al.* (1973) han mostrado que la acriflavina y el laurilsulfato sódico poseen el mismo efecto. Aunque las experiencias de curación no son concluyentes por sí mismas y deberían ser completadas con estudios formales de transferencia, los datos anteriores sugieren que, en *R. trifolii*, la infectividad podría estar codificada por determinantes genéticos extracromosómicos.

En *R. meliloti* la cuestión parece más compleja. Aunque Parijskaya (1973) informó de que el 30% de los clones tratados con naranja de acridina perdían la capacidad infectiva, los estudios llevados a cabo por el grupo de Granada sugieren la existencia de un control más complejo. Palomares (1975) pudo comprobar que la curación del pequeño plásmido PG, ya citado, producía alteraciones en la composición del polisacárido capsular. Ello repercutía en la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa en las células radicales; en las razas curadas, la capacidad inductora descende hasta en un 85% (Palomares *et al.* 1978). Sin embargo, las razas curadas seguían siendo infectivas.

Recientemente, se ha desarrollado una técnica que permite cuantificar el grado de infectividad. Su aplicación ha revelado que las razas de *R. meliloti* que han sido curadas del plásmido PG poseen un grado de infectividad menor que las silvestres (Oliveras *et al.* sometido a publicación).

Del resto de las especies de *Rhizobium* las referencias son ambiguas o inexistentes.

Efectividad.

El conocimiento del proceso de diferenciación de los bacteroides y de la formación del nódulo fijador de nitrógeno es muy limitado. No se conoce la secuencia de aparición de las diferentes enzimas implicadas en el transporte de electrones y en la fijación y transporte de nitrógeno. Tampoco se poseen datos acerca de los mecanismos genéticos que gobiernan la diferenciación.

La conversión de las bacterias vegetativas en bacteroides que se produce paralelamente al comienzo de la fijación, supone una disminución del contenido de ADN por célula. En *R. lupini* la cantidad de ADN por bacteroide desciende a un 40% y en *R. japonicum* a un 25% (Dilworth y Williams, 1967). Esta pérdida de material genético podría deberse a una degradación parcial del genomio, lo cual explicaría la subsiguiente incapacidad del bacteroide para dividirse. Cabe también la posibilidad de una pérdida aparente; admitiendo que en las bacterias vegetativas puede existir más de una copia del genomio (lo cual es corriente en el mundo bacteriano, por el retraso de la citocinesis con respecto a la replicación del cromosoma), en los bacteroides podría existir sólo una copia.

De las interacciones bacteria/planta que hacen posible la fijación simbiótica, sólo es relativamente conocida la cooperación, ya mencionada, en la síntesis de leghemoglobina.

Mutaciones que alteran la efectividad.

Disponemos de gran cantidad de referencias acerca de mutaciones que alteran el carácter Eff. En la Tabla 2 se ofrece un resumen de las mismas.

Aunque se han descrito algunas mutaciones que afectan positivamente a la efectividad, se trata de referencias muy esporádicas y su significado es dudoso. La mayor parte de los efectos descritos corresponden a mutaciones que producen un fenotipo Eff⁻.

Tabla 2

Algunas mutaciones que producen un fenotipo Eff⁻/ en *Rhizobium* spp.

<u>Especies</u>	<u>Fuente</u>	<u>Mutaciones</u>	<u>Origen</u>	<u>Comportamiento de los revertientes.</u>
<i>Rhizobium</i> spp.	Schwinghamer, 1968	Resistencia a inhib. metabólicos	Espontáneo	No descrito
<i>R. meliloti</i>	Hendry y Jordan, 1969	Vio ^r	Espontáneo	No descrito
<i>R. trifolii</i>	Schwinghamer, 1969	Rib ⁻	UV	Eff ⁺
<i>R. trifolii</i>	Lorkiewicz et al. 1971	Met ⁻ , Ade ⁻ , Cys ⁻ , His ⁻ , Gua ⁻ , Ser ⁻	UV	Eff ⁻
<i>R. trifolii</i>	Lorkiewicz et al. 1971	Met ⁻ , Cys ⁻ , Ade ⁻ , Gua ⁻ , Ser ⁻ , Thi ⁻ , Orn ⁻	NTG	Eff ⁻ , excepto Orn ⁺ y Thi ⁺
<i>R. meliloti</i>	Scherrer y Dénarié, 1971	Pur ⁻ , Pyr ⁻	NTG	Eff ⁺
<i>R. meliloti</i>	Kowalski y Dénarié, 1972	Ade ⁻ , Leu ⁻ , Ura ⁻ , Ilv ⁻	NTG	Eff ⁺

Ahora bien, los resultados deben ser convenientemente matizados, ya que en los ensayos de efectividad es corriente que aparezcan diferencias graduales. Estas diferencias existen entre las propias razas silvestres, por lo que, en rigor, sólo debe hablarse de un fenotipo Eff^- en aquellos casos en que la capacidad fijadora se pierde por completo. Cabe la posibilidad de que algunos resultados intermedios puedan ser debidos a la presencia de revertientes; pero, en general, es necesario admitir que la fijación puede ser afectada inespecíficamente por problemas de bloqueo metabólico.

Por otra parte, la mutación Eff^- puede no deberse a un efecto pleotrópico de la mutación seleccionada *in vitro*, sino a la de otro gen no detectable a primera vista. Tal es el caso de la raza L5 de *R. meliloti*, caracterizada como Lys^- . El análisis genético, llevado a cabo por Kowalski (1971) mediante transducción, demostró que el fenotipo Eff^- no era regido por la mutación Lys^- , sino por la de otro gen no cotransducible (*eff-2*).

Con respecto a las mutaciones de resistencia a antibióticos o a antimetabolitos, cabe otro tipo de consideraciones. Suele resultar muy difícil aislar revertientes sensibles a partir de los mutantes resistentes, lo cual invita a pensar que en ciertos casos, puede haber deleciones (Dénarié *et al.* 1976).

La relativa variabilidad de los resultados puede proceder de los factores incontrolados que acabamos de describir. Muchos de estos factores podrán ser eliminados cuando se disponga de un detallado mapa genético que permita localizar con precisión las diferentes mutaciones. Otros pueden ser soslayados mediante el análisis genético apropiado (Dénarié *et al.* 1976).

Aunque las salvedades anteriores obligan a aplazar la interpretación de muchos datos, en algunos casos es posible afirmar que una única mutación es simultáneamente responsable de la alteración metabólica y de la pérdida de la efectividad. Tales son las muta--

ciones Ade^- , Leu^- , Ura^- , e Ilv^- de *R. meliloti* y la mutación Rib^- de *R. trifolii*. El número de mutantes de cada tipo ha sido suficientemente alto y los resultados han sido uniformes. Además, todos los revertientes prototróficos de esos mutantes son efectivos (Schwinghamer, 1970; Dénarié y Bergeron, 1975). En el caso de la mutación Leu^- , la recuperación simultánea de la prototrofia y la efectividad ha sido también obtenida por transducción (Kowalski y Dénarié, 1972). Además, en todos los casos citados, la adición -- del nutriente requerido restaura la efectividad en un 100% (Schwinghamer, 1970; Truchet y Dénarié, 1973b).

Los mecanismos bioquímicos por los que una mutación aparentemente no relacionada puede bloquear la fijación de nitrógeno no han sido estudiados, aunque en buena lógica debe tratarse del bloqueo de determinadas vías metabólicas. En cambio, existen algunos estudios sobre la ultraestructura de los nódulos Eff^- .

En el caso de los mutantes Rib^- de *R. trifolii* y los Ade^- de *R. meliloti* el fenotipo Eff^- ha sido atribuido a la incapacidad de las bacterias vegetativas para convertirse en bacteroides (Pankhurst *et al.* 1972; Truchet y Dénarié, 1973a,b). En los nódulos formados por mutantes Ura^- de *R. meliloti* la efectividad parece hallarse bloqueada en una etapa aún más temprana, debido a que las bacterias vegetativas son incapaces de multiplicarse en el citoplasma de las células radicales (Dénarié *et al.* 1976). Los mutantes Leu^- de *R. meliloti* son incapaces de salir del cordón de infección (Dénarié *et al.* 1976).

En contraste con los anteriores, se ha descrito un mutante en el que la efectividad debe resultar bloqueada en una etapa mucho más avanzada de la formación del nódulo. Se trata de un mutante nitrato-reductasa (Nar^-) de *Rhizobium meliloti*, aislado por Kondoroski *et al.* (1973). El hecho de que la mutación Nar^- pueda -- acarrear la pérdida simultánea de la efectividad ha sugerido que

podrían existir determinantes genéticos comunes para ambos sistemas enzimáticos.

Se conocen también tres mutaciones Eff^- de *R. meliloti* no relacionadas con caracteres seleccionables *in vitro*. Una de ellas, ya citada, correspondería a un gen denominado *eff-2* (Kowalski, -- 1971). El mismo autor ha descrito el descubrimiento de otros dos genes, *eff-1*, próximo a un locus *leu* y contrasuducible con él, y *eff-3*, no ligado. (Dénarié *et al.* 1974; Kowalski, 1974).

Control por plásmidos.

La idea de que la efectividad de *Rhizobium* pudiera hallarse bajo el control de un plásmido procede de una serie de trabajos de Dunican y colaboradores en *R. trifolii*.

El tratamiento de los cultivos de *R. trifolii* con naranja de acridina, bromuro de etidio o floroglucinol incrementa significativamente la aparición de clones resistentes a la viomicina -- (Dunican y Cannon, 1971; Cannon, 1972). Todos los mutantes Vio^R son Eff^- . El análisis del ADN por centrifugación isopícnica reveló la existencia de una fracción extracromosómica, pero las experiencias de transferencia fracasaron; el plásmido no era autotransmisible (Cannon, 1972).

Una vez obtenida la transferencia del operón *nif* de *R. trifolii* a *Klebsiella aerogenes* (Dunican y Tierney, 1974), un análisis de las frecuencias de transmisión sugirió a los autores que el gen *eff* detectado en *R. trifolii* podría ser el propio operón *nif*. En la revisión de Dunican *et al.* (1976), después de considerar las características de arrastre del hipotético plásmido-*nif* autóctono por parte del factor R1-19rd, las propiedades de los híbridos nif^+ de *K. aerogenes* y el efecto de la irradiación con luz UV sobre la transferencia de los genes *nif*, los autores concluyen en que existen suficientes evidencias para considerar que los genes *nif* de *R. trifolii* se hallan en un plásmido.

GENETICA DE LA FIJACION DE NITROGENO

La mayor parte de los conocimientos actuales en torno a las bases genéticas de la fijación de nitrógeno han sido obtenidos en fijadores libres, obviamente más accesibles que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

A todo lo largo de los años sesenta se habían realizado estudios bioquímicos relativamente detallados de la fijación de nitrógeno por dos bacterias asimbióticas, *Clostridium* y *Azotobacter*. Desgraciadamente, la genética de ambos se halla, aún hoy, en una fase rudimentaria de desarrollo.

A principios de la década actual, dos grupos de investigadores se decidieron a aprovechar las técnicas de análisis genético desarrolladas en *E. coli* y aplicarlas al estudio de un pariente próximo, *Klebsiella pneumoniae*, bacteria fijadora en vida libre.

Los sistemas de transferencia genética mejor conocidos en *Klebsiella*, la conjugación (Matsumoto y Takazi, 1971) y la transducción por un fago específico (MacPhee *et al.* 1969) no han sido, al menos inicialmente, aprovechables. Streicher *et al.* (1971) observaron que ninguna raza sexualmente fértil de *K. pneumoniae* era fijadora de nitrógeno. Lo mismo ocurría con las razas de *K. pneumoniae* era fijadora de nitrógeno. Lo mismo ocurría con las razas de *K. pneumoniae* y *K. aerogenes* sensibles a un fago específico. En cambio, hallaron que algunas razas fijadoras de *K. pneumoniae* --- eran sensibles al fago transductor general P1, que también es activo contra *E. coli* y *Shigella* (Lennox, 1955).

La transducción generalizada mediada por el fago P1 permitió transferir los genes *nif* a razas *K. pneumoniae nif⁻* (Streicher

et al. 1971). El subsiguiente análisis por contranducción reveló que los genes *nif* se hallan próximos al operón *his* en el mapa de ligamiento de *Klebsiella* (Streicher *et al.* 1971).

Simultáneamente, el grupo de la Universidad de Sussex obtuvo la transferencia de los genes *nif* de *K. pneumoniae* por conjugación. El plásmido conjugativo utilizado fué un factor R "I-like" desreprimido, denominado R144drd3, previamente transferido a *Klebsiella* desde el huésped primario, *E. coli* (Dixon y Postgate, 1971).

Aunque la mayor parte de las mutaciones que producen un fenotipo Nif^- en *Klebsiella* se localizan efectivamente en el minuto 38-40, es decir, próximas a *his*, ocasionalmente aparecen fenotipos no fijadores que no llevan ninguna mutación en esa región --- (Streicher *et al.* 1972b). La interpretación de este hecho no ofrece dificultad admitiendo la existencia, en zonas lejanas, de genes correlacionados con la función *nif* (equivalentes a los genes *eff* de *Rhizobium*). Hay que admitir, además la posibilidad de un efecto pleotrópico de genes no relacionados.

Algunas mutaciones nif^- pueden ser fácilmente caracterizadas desde el punto de vista bioquímico, especialmente aquellas -- que sólo afectan a una subunidad de la nitrogenasa (Streicher *et al.* 1972b).

También se han detectado deleciones que afectan al operón *nif* (Streicher *et al.* 1972a). El estudio de los mutantes que llevan deleciones en esa zona ha permitido determinar que el operón *nif* de *Klebsiella* es vecino del gen *shiA* por el extremo contrario a *his* (Shanmugam *et al.* 1974).

Los genes *nif* de *Klebsiella* han sido transferidos a una raza no restrictora de *E. coli* por medio del plásmido R144rd3 (Dixon y Postgate, 1972). Previendo que la selección directa de recombi-

antes nif^+ podía ser afectada por problemas de expresión fenotípica, el marcador seleccionado fue his^+ . Gran parte de los exconjugantes *E. coli* his^+ eran también nif^+ . En su nuevo huésped, los genes nif de *Klebsiella* continuaban siendo sensibles a la represión por amonio, lo cual parece indicar que habían sido transferidos - tanto los genes estructurales como los reguladores.

El hecho de que algunos híbridos *E. coli* nif^+ produjeran - con alta frecuencia segregantes nif^- indicó la posibilidad de que el exogenote no hubiera sido recombinado en el cromosoma recipiente, hecho frecuente en los cruces intergenéricos (Baron *et al.* -- 1968). El análisis llevado a cabo por Cannon *et al.* (1974a,b) reveló la existencia de dos tipos de híbridos *E. coli* nif^+ . En los híbridos estables el exogenote había sido integrado en la región his en el orden $rfb - nif - gnd - his$, es decir, con algunos reajustes atribuibles a las operaciones de inserción del ADN heterólogo. En cambio, en los híbridos *E. coli* nif^+ inestables los genes nif formaban parte de plásmidos de peso molecular muy variable. Aunque podían ser movilizados por factores R, ninguno de esos plásmidos era autotransmisible.

Con posterioridad ha sido posible aislar factores de tipo F-prima capaces de arrastrar el operón nif de *Klebsiella* (Dixon, 1974; Cannon *et al.* 1976). Algunos de estos factores son transferibles a *Salmonella*, *Proteus* y *Erwinia* y pueden constituir herramientas útiles para el estudio de la expresión y la regulación de los genes nif en diferentes huéspedes. Sin embargo, su uso ha sido desplazado por el de los factores R del grupo de incompatibilidad P1 de *Pseudomonas aeruginosa*, que poseen mayor promiscuidad. El factor RP4.1 (Dixon *et al.* 1976) ha servido para la transferencia intergenérica de los genes nif de *Klebsiella* desde el fijador artificial *E. coli* nif^+ a *Azotobacter vinelandii* (Cannon y Postgate, 1976). Los autores utilizaron la colección de mutantes nif^- de *A. vinelandii* caracterizados bioquímicamente por Shah *et al.* (1973).

Con respecto a *Rhizobium*, únicamente es posible citar las experiencias de transferencia del operón *nif* de *R. trifolii* a *Klebsiella aerogenes* (Dunican y Tierney, 1974), que son comentadas en otros apartados. Dado el momento en que aparecieron, estas experiencias fueron el primer indicio de que *Rhizobium* portaba los genes *nif*, un año antes de que aparecieran los primeros trabajos sobre fijación en vida libre.

Los trabajos más recientes sobre genética de la fijación constituyen intentos de profundizar en el análisis de la organización, funcionamiento y regulación del operón *nif*. La expresión de los genes *nif* e *his* de *Klebsiella* en *Salmonella typhimurium* ha sido estudiada en detalle por Postgate y Krihsapillai (1977). Aunque no es el caso de *Salmonella*, los exogenotes *nif* podrían hallar dificultades para expresarse en sus nuevos huéspedes. Con vistas a los estudios de expresión, Alden y Rogers (1977) han ensayado la introducción de plásmidos-*nif* en minicélulas de *E. coli*.

Por otra parte, se han llevado a cabo experiencias de complementación intragénica del operón *nif* de *Klebsiella* con objeto de obtener un mapa de estructura fina (Dixon *et al.* 1977). Paralelamente, Ausubel *et al.* (1977b) han recurrido al uso de endonucleasas restrictivas para la construcción *in vitro* de pequeños plásmidos amplificables a partir de fragmentos de RP4.1-*nif*.

REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO

La expresión fenotípica de los genes *ni_l*, aparte de estar sometida al control, específico o no, que sobre ellos ejercen -- otros genes (ej. genes *e₁* de *Rhizobium*) posee su propio sistema de regulación. Dicho sistema es particularmente bien conocido en *Klebsiella pneumoniae*, gracias a los trabajos del grupo de la -- Universidad de California en San Diego. La regulación de *Klebsiella* está sirviendo, además, como modelo de trabajo en *Rhizobium*.

Modelo de *Klebsiella pneumoniae*.

En los fijadores libres, la biosíntesis de la nitrogenasa es reprimida por el producto de la fijación, el amonio, o por -- otras fuentes de nitrógeno disponible (Wilson *et al.* 1943; Streicher *et al.* 1972). La ausencia de represor, es decir, la caren-- cia de nitrógeno fijado en el entorno celular, dispara la biosíntesis de la nitrogenasa.

El modelo de regulación propuesto para *Klebsiella pneumoniae* ha tomado como ejemplo el mecanismo de regulación de la utilización de la histidina (*hut*) en *Klebsiella aerogenes* (Prival y Magasanik, 1971).

La represión de la nitrogenasa por el amonio no se reduce a una inhibición "feed-back" de la actividad catalítica; se trata de un sofisticado mecanismo de modulación en el que interviene de forma decisiva la glutamina-sintetasa. La glutamina-sintetasa de *Klebsiella* posee, además de la actividad catalítica (síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato), una función - reguladora: en ausencia de amonio, la glutamina-sintetasa activa la transcripción del operón *ni_l*, posiblemente por facilitar el -

anclaje de la ADN-ARN polimerasa (Streicher *et al.* 1974; Shanmugam *et al.* 1976).

Según este modelo, la adición de amonio (o de cualquier otro de los compuestos que reprimen la biosíntesis de la nitrogenasa) - dispara el sistema enzimático que regula la actividad de la glutamina-sintetasa. Dicho sistema, conocido como "cascada enzimática - de adenilación", cataliza la modificación covalente de la glutamina-sintetasa, por adición de radicales adenilo a restos *tyr* de la proteína. La adenilación bloquea el enlace de la glutamina-sintetasa al promotor *nif* y la transcripción cesa. Es decir, en presencia de su substrato, la glutamina-sintetasa adquiere la actividad catalítica y pierde la capacidad reguladora. Inversamente, en ausencia de amonio se produce la desadenilación y la glutamina-sintetasa -- puede anclarse de nuevo al promotor *nif* y activar la transcripción.

Existen abundantes pruebas experimentales que apoyan la validez de este modelo. Determinados mutantes que requieren glutamina (*glnA⁻*) son incapaces de sintetizar nitrogenasa (Shanmugam *et al.* 1974). Ello parece indicar que la mutación que destruye la actividad catalítica de la glutamina-sintetasa puede, al mismo tiempo, - bloquear la actividad reguladora. Pero además, cuando los mutantes *K. pneumoniae glnA⁻* adquieren de nuevo el alelo *gln⁺* silvestre por conjugación con *E. coli* F' 133, los híbridos inestables *K. pneumoniae* F' 133 / *gln⁺* se comportan como *nif⁺*. (Shanmugam *et al.* 1974).

El hecho de que la glutamina-sintetasa de *E. coli* resulte totalmente activa en *K. pneumoniae* concuerda con resultados previamente conocidos: la represión por amonio de los genes *nif* de *Klebsiella* en *E. coli* (Dixon y Postgate, 1972) y la afinidad serológica de ambas glutamina-sintetasas (Tronick *et al.* 1973).

Otras pruebas a favor del modelo de Streicher *et al.* (1974) proceden del trabajo con mutantes constitutivos para la glutamina-sintetasa (*glnC⁻*). Aunque no se han obtenido resultados uniformes;

algunos mutantes *glnC*⁻ se comportan como nitrogenasa-constitutivos. La variabilidad de los resultados no constituye una objeción a la validez del modelo, pues hay que admitir la posibilidad de que la afinidad de la glutamina-sintetasa por el promotor *nif* pueda ser diferente en cada mutante (Shanmugam *et al.* 1974). Una detallada descripción del aislamiento de mutantes del tipo inverso, es decir, del promotor *nif*, se encuentra en Ausubel *et al.* (1977b). - Las mutaciones del promotor afectan a la regulación por la glutamina-sintetasa. Otra elegante prueba ha sido obtenida por Cannon *et al.* (1974); cuando se introduce el factor F'*nif* de *E. coli* en *K. aerogenes nif*⁻ *glnC*⁻, la actividad nitrogenasa no es reprimida por la presencia de amonio.

Algunos descubrimientos recientes indican que el mecanismo de regulación es más complejo aún y que la glutamina-sintetasa sólo es un elemento de la red de control. Shanmugam y Morandi (1976) han señalado que la adición de casaminoácidos reprime la biosíntesis de la nitrogenasa. Posteriormente, se ha indicado que combinaciones más simples de aminoácidos ejercen el mismo efecto (Shanmugam *et al.* 1977). Por tanto, el mecanismo global de regulación depende de la conversión del amonio en aminoácidos; esta conversión constituiría un requisito previo para la represión por el amonio (Shanmugam *et al.* 1977).

Por otra parte, se ha especulado con la posibilidad de que - en el operador-promotor *nif*, además del *locus* de anclaje de la ADN-ARN polimerasa y el punto de fijación de la glutamina-sintetasa, - existan otros *loci* para la fijación de proteínas reguladoras no conocidas. Por ejemplo, se ha sugerido la existencia de algún mecanismo de regulación que pudiera reprimir los genes *nif* en presencia de oxígeno; podría tratarse de una proteína reguladora capaz de responder al estado redox de la célula (StJohn *et al.* 1974). Ausubel *et al.* (1977a) han aislado mutantes de *K. pneumoniae* en los

que la expresión de la nitrogenasa es independiente del control de la glutamina-sintetasa; algunos de estos mutantes $ni^{\delta}_{GS\ ind}$ son --sensibles a la represión por amonio. Ello sugiere la existencia de un represor sensible al amonio que pudiera ejercer un control negativo sobre la expresión del operón ni^{δ} .

Regulación de la fijación en *Rhizobium*.

O'Gara y Shanmugam (1976) han descrito que las especies de *Rhizobium* que fijan nitrógeno en vida libre excretan en forma de amonio la mayor parte del nitrógeno fijado. Ello coincide con los resultados obtenidos en bacteroides de nódulos de soja (Bergersen y Turner, 1967). Tubb (1976) indica que la raza fijadora libre *Rhizobium* sp. 32H1 excreta amonio al medio cuando el crecimiento tiene lugar en glutamato, pero no si el amonio es la única fuente de nitrógeno fijado. Pero lo más sorprendente es que, a diferencia de los fijadores clásicos, la presencia de amonio no reprime la actividad nitrogenasa. (Ludwig, 1978a).

Sin embargo, se ha descrito que la glutamina-sintetasa de *Rhizobium*, como la de *Klebsiella* y la de *E. coli*, es sensible a la represión por amonio. Este hecho plantea serios interrogantes en torno a la posibilidad de extrapolar a *Rhizobium* el modelo de Streicher *et al.* En los bacteroides existe un bajo nivel de glutamina-sintetasa, insuficiente para utilizar todo el ión amonio producido por la nitrogenasa (Brown y Dilworth, 1975; Robertson *et al.* 1975; Kurz *et al.* 1975). De esta forma, existe siempre un exceso de amonio, -susceptible de ser excretado.

Ahora bien, Ludwig y Signer (1976) han obtenido un mutante de *Rhizobium* sp. 32H1 gln^{-} que es deficiente en actividad nitrogenasa y han demostrado que los mutantes gln^c son al mismo tiempo nitrogenasa-constitutivos. Estos resultados coinciden con los de Kondrosi *et al.* (1973) en *R. meliloti* y, por supuesto, con los obte-

nidos en *Klebsiella*.

Para deshacer la aparente contradicción de los datos se puede interpretar que la clave de la regulación, en *Rhizobium*, se halla en el glutamato. Puesto que el glutamato inhibe no sólo la utilización del amonio exógeno sino también la utilización del amonio intracelular producido por la fijación, se supone que el glutamato es capaz de reprimir las enzimas responsables de la asimilación de NH_4 , entre las cuales se halla la glutamina-sintetasa (Tubb, 1976). Si es así, el glutamato, como responsable de la excreción de amonio, ejercería una función crucial determinando el carácter simbiótico y no parasítico de la asociación *Rhizobium*-leguminosa (Tubb, 1976; Shanmugam *et al.* 1976).

Evidentemente, los datos disponibles son demasiado fragmentarios para obtener de ellos alguna conclusión firme. Si el glutamato únicamente inhibe la capacidad catalítica de la glutamina-sintetasa, el modelo de Streicher *et al.* podría adaptarse a la fijación simbiótica. Si, por el contrario, la actividad del glutamato consiste en una represión de la síntesis de GS, será necesario admitir que los bacteroides se comportan como los mutantes *ni⁺* deprimidos *K. pneumoniae*.

Ludwig (1978b) indica que en *Rhizobium* sp. 32H1 se detectan dos discretas actividades de glutamina-sintetasa. Una de ellas es prácticamente constitutiva; la otra es inducible bajo condiciones de limitación de amonio, pero se halla totalmente reprimida en exceso de amonio. Estos resultados sugieren que la GS convencional actúa proporcionando la glutamina necesaria para la biosíntesis y que la forma inducible facilita el crecimiento en amonio como fuente de nitrógeno. Cualquiera de las dos formas podría regular la expresión de la nitrogenasa.

TRANSFERENCIA GENETICA EN *Rhizobium*Transformación

Lo que podemos denominar "la prehistoria de la genética de *Rhizobium*" está representada por una serie de experiencias de -- transformación llevadas a cabo en los años cuarenta y cincuenta. El momento histórico era propicio, puesto que la genética molecular se hallaba en plena efervescencia. Como la transformación -- fué el primer sistema de transferencia descubierto (Griffith, -- 1928) y en los años cuarenta ya era relativamente bien conocido, es lógico que las primeras investigaciones en *Rhizobium* se dirigieran en este sentido.

Pero además, hasta la reciente introducción en *Rhizobium* spp. de plásmidos conjugativos exógenos, la transformación ha sido el sistema de transferencia más eficaz y más ampliamente usado.

Se han llevado a cabo experiencias de transformación con ADN, con extractos celulares y con filtrados de cultivo y se ha dado cuenta de la transferencia de marcadores de resistencia a antibióticos, nutritivos y de características simbióticas (especialmente Hsp/Inf). Desde la perspectiva actual, la significación de muchos trabajos, y especialmente de los más primitivos, es dudosa o puramente simbólica; en muchos casos la metodología no -- ofrecía las garantías suficientes. Como señalaron en su momento Humphrey y Vincent (1963), los resultados únicamente son fiables cuando se usan razas receptoras marcadas. Se citarán pues, las experiencias que han cumplido este requisito y alguna de las que no cumpliéndolo, poseen sin embargo un valor histórico.

La primera referencia a la transformación de *Rhizobium* spp. procede de los trabajos de Krassilnikov (1941), relativos a la -- transferencia interespecífica del carácter Hsp/Inf⁺ por medio de

filtrados de cultivos. De todos modos, como señala Schwingamer (1974), el mayor estímulo para el desarrollo de los estudios de transformación en *Rhizobium* provino del extenso trabajo exploratorio de Balassa y colaboradores.

Balassa (1954) dió cuenta de la transferencia del carácter Hsp/Inf⁺ usando lisados obtenidos por ruptura ultrasónica o por tratamiento con penicilina. Dichos lisados podían ser reemplazados por ADN purificado y la transferencia genética era sensible a la ADN-asa, hechos que indican fehacientemente que el principio transformante era ADN. Al transformar una raza de *R. lupini* con ADN procedente de *R. trifolii*, la raza receptora adquiría la capacidad de formar nódulos en alfalfa. Para estas experiencias se utilizó un donador Str^F y un receptor Str^S, pudiéndose comprobar que las bacterias aisladas de los nódulos conservaban el carácter Str^S.

El mismo autor, en trabajos sucesivos (1957, 1960) con razas de *R. lupini*, *R. japonicum* y *R. meliloti*, demostró que la frecuencia de transformación depende de tres factores: la transformabilidad de la raza receptora, la naturaleza de la mutación que es transformada y el grado de homología genética entre las razas donadora y receptora. En las razas transformables estudiadas por Balassa, la competencia alcanzaba el máximo al principio de la fase logarítmica de crecimiento y la concentración saturante de ADN se hallaba entre 0.2 y 0.5 µg/ml.

Muchos de los resultados obtenidos por Balassa han sido confirmados posteriormente por otros autores. Existe una absoluta unanimidad en señalar que el momento de máxima competencia se alcanza en la fase logarítmica temprana (Balassa y Gábor, 1961; Zelazna 1963; Mareckova, 1970; Raina y Modi, 1969, 1971). En los trabajos de Zelazna *et al.* (1963, 1964) se describe que la competencia de *R. trifolii* se presenta en ciclos, que coinciden aproximadamente

con el tiempo de generación. La frecuencia de los ciclos depende de diversos factores, tales como la concentración de células, la aireación, la cantidad de polisacárido extracelular producido y el medio usado. Resultados similares han sido obtenidos en *R. meliloti* (Zelazna-Kowalska y Lorkiewicz, 1971) y *R. lupini* (Raina y Modi, 1972).

En cambio, no existe uniformidad a la hora de determinar la concentración de saturación de ADN. Los valores dados por distintos autores desde 0.2 a 40 $\mu\text{g/ml}$.

Otro punto de controversia se refiere al efecto que el ADN no transformante tiene sobre el rendimiento del proceso. Balassa (1957) describe que el ADN no transformante disminuye la eficiencia del ADN transformante, mientras que Zelazna-Kowalska y Lorkiewicz (1971) dan cuenta del efecto contrario, que atribuyen a una protección inespecífica contra la acción de las nucleasas. La hipótesis de Zelazna-Kowalska y Lorkiewicz parece muy plausible. De hecho, Raina y Modi (1971) han purificado parcialmente dos nucleasas de *Rhizobium* sp. "cowpea" y han sugerido que las nucleasas -- pueden ser responsables de la alta concentración de ADN requerida para la transformación de *Rhizobium* (sobre todo, si se compara -- con *Bacillus subtilis* o *Haemophilus influenzae*).

Un factor particularmente interesante es la cantidad de polisacárido extracelular producido. El polisacárido capsular interfiere la transformación; por tanto, es aconsejable utilizar como receptoras razas mutantes de tipo semirrugoso o rugoso en lugar de las razas silvestres de tipo mucoso (Balassa, 1960; Zelazna, 1963).

En todos los casos, para la expresión fenotípica de la transformación es necesario un período de crecimiento correspondiente a 2-3 divisiones celulares (Balassa y Gábor, 1961; Zelazna, 1963).

Las frecuencias de transformación obtenidas con marcadores nutritivos y de resistencia oscilan desde 10^{-7} hasta valores cercanos al 1% (Balassa, 1963; Raina y Modi, 1971). En general, la frecuencia depende del grado de homología aparente entre el donador y el receptor. Las frecuencias más bajas se obtienen en la transformación interespecífica y las más altas en la transferencia dentro de una misma raza, particularmente si se usa ADN de donadores ya transformados.

Zelazna (1964) señala también que la frecuencia de transformación registra un incremento si los cultivos de la raza recipiente se someten a un enfriamiento previo, de acuerdo con el método clásico desarrollado para la transformación pneumocócica (Hotchkiss, 1954).

La lista de marcadores transferidos por transformación es, curiosamente, menos extensa que el número de trabajos. La mayor parte de las publicaciones más antiguas se refiere invariablemente a la transferencia de caracteres simbióticos, sobre todo Hsp/Inf. Ya se ha indicado anteriormente la dudosa significación de algunos trabajos. Esta observación es especialmente válida para aquellas experiencias en las que se usó polisacárido capsular como material transformante (Lange y Alexander, 1960; Ljunggren, -- 1961), por no existir garantías de la esterilidad de dicho material.

Posteriormente, un gran número de trabajos han dado cuenta de la transferencia de marcadores de resistencia y especialmente del carácter Str^r . En la Tabla 3 se ofrece un resumen de las experiencias de transformación intra e interespecífica.

Existen también abundantes referencias de transformación intergenérica usando *Rhizobium* como donador o como receptor. Cronológicamente, los primeros datos se hallan en los trabajos de Krasilnikov (1945), que informó de la transferencia del carácter Hsp/Inf⁺ de *Rhizobium* a *Pseudomonas*. Este resultado debe ser juzgado -

con alguna reserva: en ausencia de bacterias infectivas, las raíces de leguminosas desarrollan con cierta frecuencia pseudonódulos de origen desconocido.

También se han llevado a cabo experiencias de transformación entre *Rhizobium* y *Agrobacterium*. La transformación es fácilmente demostrable en ambos sentidos. De los marcadores transferidos, po se particular interés la transferencia a *Rhizobium leguminosarum* de los genes tumorales de *Agrobacterium tumefaciens* (Kern, 1969).

Un grupo importante de experiencias se refiere a la transformación, con fines diversos, de *Azotobacter* con ADN de *Rhizobium* spp. Los primeros datos en este sentido fueron facilitados por Sen *et al.* (1969), quienes transformaron razas de *A. vinelandii* y *A. chroococcum* con ADN procedente de *R. leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. trifolii*. Los marcadores transferidos fueron la resistencia a la estreptomina y la resistencia al cristal violeta.

Sin embargo, estas experiencias han sufrido grandes dificultades, debido a que los factores que regulan la competencia en *Azotobacter* no eran bien conocidos. Los trabajos de Page y Shadoff (1976, a,b) han supuesto una gran aportación en este terreno y sus efectos no se han hecho esperar.

Bishop *et al.* (1977) han transformado *A. vinelandii nif⁻* con ADN de *R. trifolii*, obteniendo transferencia del operón *nif* y de los genes responsables de la aglutinación con la trifolina. La transformación de *A. vinelandii nif⁻* a *nif⁺* también ha sido obtenida -- por Page (1978).

En una experiencia ya mencionada, Maier *et al.* (1977) describen la transformación de *A. vinelandii nif⁻* con ADN de *R. japonicum*. De 50 transformantes *nif⁺* examinados, 3 habían recibido también los genes que codifican la síntesis del antígeno O, que sólo está presente en las razas *Inf⁺* de *R. japonicum*.

Tabla 3

/ Transformación en *Rhizobium* spp. /

Especies	Fuente	Caracteres transferidos	
		Generales	Simbióticos
<i>Rhizobium</i> spp.	Krassilnikov, 1941	-	Hsp/Inf ⁺
<i>Rhizobium</i> spp.	Balassa, 1953, 1957, 1960	Str ^r , Str ^d , Pen ^r , Cys ⁺ y otros	Hsp/Inf ⁺ .Eff ⁺
<i>R. lupini</i>	Balassa y Gábor, 1961	Str ^r , Str ^d	-
<i>R. meliloti</i>	Szende <i>et al.</i> , 1961	Profago	-
<i>R. trifolii</i>	Kleczkowska, 1965	-	Eff ⁻
<i>R. trifolii</i>	Zelazna, 1963	Str ^r	-
<i>R. japonicum</i>	Mareckova, 1969	Str ^r	Inf ⁺
<i>Rhizobium</i> sp. "cowpea"	Raina y Modi, 1969, 1971	Ade ⁺	-
<i>R. trifolii</i>	Zelazna-K. y Lorkiewicz, 1971	Str ^r	Hsp/Inf ⁻
<i>R. meliloti</i>	Zelazna-K. y Lorkiewicz, 1971	Str ^r	-

Finalmente, debemos citar que la transformación intergenérica ha sido usada para transferir a *Rhizobium* algunos plásmidos, concretamente el factor RP4 desde *E. coli* (O'Gara y Dunican, 1973) y el factor R1-19drd desde *Pseudomonas aeruginosa* (Dunican y Tierney 1973). Aparentemente, estas experiencias han perdido relieve desde que se ha generalizado el uso de la conjugación mediada por factores R. Sin embargo, constituyen un precedente interesante de cara a una eventual introducción en *Rhizobium* spp. de plásmidos no conjugativos.

Transfección

Sólo se han llevado a cabo experiencias de transfección en *R. meliloti*. En todos los casos, tanto la frecuencia de infección como la eficiencia de transfección han sido muy bajas (Sik y Orosz, 1971; Staniewski *et al.* 1971). El uso de un fago coadyuvante puede incrementar la frecuencia desde 10^{-8} hasta los alrededores de 10^{-6} por molécula de ADN de fago (Kondorosi *et al.* 1974). El uso de esferoplastos en lugar de células intactas también mejora el rendimiento del proceso (Staniewski y Rugala, 1975).

Las mayores limitaciones parecen derivarse de la baja competencia desarrollada por los cultivos, puesto que el incremento de la concentración de ADN no produce un aumento del número de transfectantes (Staniewski y Rugala, 1975).

Conjugación

Aparte de su interés para la comprensión del comportamiento natural de *Rhizobium*, la conjugación es un sistema analítico de primera magnitud. La transferencia de amplios segmentos de cromos-

soma puede ser una herramienta de gran utilidad en el estudio de la simbiosis. Deben distinguirse, por tanto, dos enfoques (Dénarié y Truchet, 1974):

a) la búsqueda de sistemas naturales de conjugación en *Rhizobium* spp.

b) la introducción en *Rhizobium* spp. de plásmidos conjugativos procedentes de otras bacterias.

Todas las experiencias de búsqueda de un sistema conjugativo natural en *Rhizobium* spp. han tomado como referencia los trabajos, ya mencionados, de Higashi (1967). En ellos se daba cuenta de la transferencia, supuestamente mediada por un plásmido, del carácter Hsp/Inf⁺ de *R. trifolii* a *R. phaseoli*. Sin embargo, a excepción del detallado estudio de Heumann y colaboradores en *R. lupini*, la descripción convincente de sistemas conjugativos naturales en *Rhizobium* spp. ha fracasado. Los trabajos de Bose y Venkataraman (1969), Lorkiewicz *et al.* (1971) y Kaushik y Venkataraman (1972) no han obtenido transferencia con frecuencias suficientemente alejadas de la de retromutación espontánea, por lo que su significación es difícil de precisar.

Heumann (1968) describió un sistema natural de conjugación en *R. lupini*, usando marcadores nutritivos y de pigmentación. Por desgracia, la raza empleada no es capaz de formar nódulos, por lo que no es útil para el estudio genético de la simbiosis. Heumann *et al.* (1971, 1973), Puhler (1972) y Schöffl *et al.* (1974) han estudiado en profundidad dicho sistema de conjugación, descubriendo la existencia de dos factores de fertilidad, *Fc* y *Fd*, que activan la transferencia de regiones diferentes del cromosoma. Las células de *R. lupini* son isosexuales y, en los apareamientos, el carácter de donador y receptor es determinado por el estado fisiológico: las células en fase logarítmica actúan como donadoras; las

células en fase estacionaria actúan como receptoras (Heumann *et al.* 1974). Los factores de fertilidad son cromosómicos y durante la transferencia preceden al resto de marcadores del segmento transferido.

Utilizando marcadores de pigmentación y analizando la segregación de transconjugantes merodiploides de *R. lupini*, Heumann y Springer (1977) han demostrado la existencia de verdadera recombinación, haploidización y estabilización del exogenote dentro del cromosoma. El comportamiento de *R. lupini* no parece diferir, en este aspecto, del de *E. coli* (Lederberg, 1949; Johnson *et al.* 1975).

Independientemente del interés de estos trabajos, la tendencia más general, en los últimos años, ha sido la introducción de plásmidos conjugativos exógenos en *Rhizobium* spp.

El factor F'-*lac* ha sido transferido de *E. coli* K12 A *R. lupini* (Datta y Hedges, 1972). También se ha ensayado la conjugación de merodiploides estables de *E. coli* K12 que llevan los episomas F131, F110 o F133 con mutantes auxotróficos de *R. lupini* - (Mergeay *et al.* 1973). La frecuencia de transmisión de marcadores nutritivos oscilaba entre 5×10^{-4} y 10^{-6} por receptor. Los exconjugantes prototróficos no resultaron estables y se supuso que se trataba de heterogenotes. Los mismos autores obtuvieron el primer test de complementación en *Rhizobium*, mediante la transferencia del factor F'110-*met* a *R. lupini* Met⁻. Desgraciadamente, la raza silvestre usada inducía la formación de nódulos inefectivos en todos los huéspedes probados; su utilidad para el estudio de la simbiosis es evidentemente escasa.

Hasta el momento, los plásmidos exógenos que proporcionan mejores resultados para el análisis genético de *Rhizobium* son los factores R del grupo de incompatibilidad P1. Dichos plásmidos, -- que son capaces de promover transferencia cromosómica en su hués-

ped primario, *Pseudomonas aeruginosa* (Stanisich y Holloway, 1971), poseen una gran promiscuidad dentro de las bacterias gramnegativas (Datta *et al.* 1971; Olsen y Shipley, 1973). Son fácilmente transferibles a *E. coli* (Sykes y Richmond, 1970), pero su mayor utilidad es la promoción de transferencia cromosómica en algunas especies bacterianas que no parecen poseer factores sexuales propios: *Acinetobacter calcoaceticus* (Towner y Vivian, 1976), *Pseudomonas glycinis* (Lacey y Leary, 1976), *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton *et al.* 1976), etc.

Los plásmidos R del grupo de incompatibilidad P1 poseen, como otros muchos factores R, unidades complejas de transposición, del tipo denominado *Tn* según la nomenclatura de Campbell *et al.* (1977). La genética de los elementos de inserción y de transposición explica algunas particularidades del comportamiento de los factores R del grupo P1. Se supone que las secuencias *Tn* son responsables de la inserción del plásmido en el cromosoma bacteriano (Heffron *et al.* 1975) o en otro plásmido (Jacoby y Jacob, 1977). La construcción *in vitro* de R-primas no incrementa la eficiencia del factor RP4 para movilizar cromosoma, a diferencia de lo que ocurre entre los factores F y F' de *E. coli* (Low, 1972). Ello parece indicar que el nivel de homología no es el factor limitante de la movilización de cromosoma por el factor RP4 y similares. Como además todos los factores R del grupo P1 pueden insertarse en múltiples lugares del cromosoma huésped, puede aventurarse la hipótesis de que la capacidad de inserción reside en las secuencias *Tn*. En cualquier caso, se ha comprobado que la inserción del factor R68.45 en el cromosoma de *E. coli* requiere una función *recA* (Kondorosi *et al.* 1977).

El factor RP4 (Datta *et al.* 1971) ha alcanzado gran popularidad. Es fácilmente transmisible de *E. coli* a *R. trifolii* (Datta y

Hedges, 1972), *R. meliloti* (Datta y Hedges, 1972) *R. leguminosarum* (Beringer, 1974) y *R. lupini* (Pühler *et al.* 1974). Es igualmente transmisible en cruces intraespecíficos de *R. leguminosarum* (Beringer, 1974, 1976), *R. lupini* (Pühler *et al.* 1974) y *R. meliloti* -- (Meade y Signer, 1977). En todos los casos se ha demostrado movilización de cromosoma. Meade y Signer (1977) han usado el factor RP4 para construir un mapa de ligamiento de *R. meliloti*. Hooykaas *et al.* (1977) han obtenido la transferencia, mediada por RP4, del plásmido tumorogénico TI de *Agrobacterium tumefaciens* a una raza (no - especificada) de *Rhizobium*. Boucher *et al.* (1977) han introducido, por medio de RP4, el bacteriófago Mu de *E. coli* en *Pseudomonas solanacearum* y en *R. meliloti*.

Ultimamente, el factor RP4 está siendo desplazado por un nuevo factor R del mismo grupo de incompatibilidad, denominado R68.45 (Haas y Holloway, 1976). Se trata de un plásmido más eficiente para arrastrar cromosoma y por tanto de gran utilidad para la construcción de mapas de ligamiento. Con este fin ha sido usado en *R. meliloti* (Kondorosi *et al.* 1977) y *R. leguminosarum* (Beringer *et al.* 1978). Se ha demostrado que el factor R68.45 puede promover cruces interespecíficos, al menos entre *R. leguminosarum* y *R. meliloti* (Johnston *et al.* 1978). Los primeros autores describen la formación de R-primas.

El mapeo cromosómico es de capital importancia para la detección y localización de los genes simbióticos de *Rhizobium*. Ya se ha indicado que las mutaciones de dichos genes no son selecciona--bles *in vitro*; pero es importante disponer de un mapa cromosómico para poder localizar las que se vayan descubriendo. Antes de la inroducción del uso de factores R, se había intentado la construc--ción de mapas de ligamiento por conmutación, aprovechando la capacidad de la Nitrosoguanidina para "barner" las zonas en replicación (Cerdá-Olmedo *et al.* 1968). No se han obtenido resultados relevantes (véase Dénarié y Truchet, 1974).

Hoy por hoy, los mapas de ligamiento elaborados son relativa

Tabla 4

/ Mapas cromosómicos de ligamiento en *Rhizobium* spp. /

<u>Especie</u>	<u>Fuente</u>	<u>Promoción de la transferencia</u>	<u>Nº marcadores</u>
<i>R. lupini</i>	Heumann <i>et al.</i> 1971	Factores endógenos <i>f_c</i> y <i>f_d</i>	18
<i>R. meliloti</i>	Meade y Signer, 1976	RP4	20
<i>R. meliloti</i>	Kondorosi <i>et al.</i> 1977	R 68.45	19
<i>R. leguminosarum</i>	Beringer <i>et al.</i> 1978	R 68.45	16

mente cortos. Todos ellos, sin embargo, representan la puesta a punto de la metodología adecuada. Es de suponer que podrán ser ampliados en breve. En la Tabla 4 se ofrece una relación de los mapas disponibles.

Transducción

Aunque Heumann *et al.* (1972) han descrito brevemente un sistema de transducción general por el fago ρ -1 en *R. lupini*, la mayor parte de las referencias sobre transducción en *Rhizobium* proceden de trabajos llevados a cabo en *R. meliloti*.

Sik y Orosz (1971) descubrieron que el fago 16-3 de *R. meliloti* (Szende y Ordogh, 1960) era capaz de llevar a cabo transducción especializada. Trabajos posteriores (Sváb *et al.* 1973; Sváb *et al.* 1978) han precisado las características del sistema *R. meliloti* / 16-3. La transducción especializada se restringe a un marcador *cys*, con una frecuencia de 10^{-6} - 10^{-7} por unidad formadora de placa. La mayor parte de los transductantes son heterogenotes para el marcador *cys*⁺ y producen lisados HFT (10^{-2} por unidad formadora de placa).

También se ha descrito un sistema de transducción generalizada por medio del fago de *R. meliloti* denominado L5 (Kowalski, -1967). Dicho sistema ha sido aprovechado para el estudio de mutantes auxotróficos de *R. meliloti* con alteraciones del carácter Eff. En esos mutantes, es importante saber si un mismo gen controla si simultáneamente la capacidad fijadora y la vía metabólica alterada o si, por el contrario, existen dos mutaciones vecinas (posibilidad a tener muy en cuenta si los mutantes han sido obtenidos con nitrosoguanidina). Las experiencias de cotransducción en mutantes *Leu*⁻ y *Lys*⁻ (Kowalski, 1970, 1971, 1976; Kowalski y Dénarié, 1972)

han permitido detectar la existencia de los tres hipotéticos genes $e_{1/2}$ descritos en el apartado de mutaciones que alteran la -- efectividad.

Hasta ahora, la transducción no ha podido ser usada más ampliamente por la falta de un mapa "bruto" de ligamiento que permita planificar, con unas mínimas posibilidades de éxito, los -- análisis de estructura fina.

ORIGEN Y EVOLUCION DE LOS SISTEMAS FIJADORES DE NITROGENO

Filogenia de la nitrogenasa

La nitrogenasa posee dos características que parecen indicar un origen muy antiguo: el carácter reductor y el requerimiento de anaerobiosis. Estos rasgos parecen los más adecuados para un enzima que hubiera de funcionar en la primitiva atmósfera anaerobia (Postgate, 1971). Téngase en cuenta que el desarrollo de la nitrogenasa en la atmósfera oxidante actual exigiría la existencia previa de los sofisticados mecanismos de exclusión del oxígeno y del sistema de transporte de electrones a la nitrogenasa, no menos complejo. Resulta difícil admitir que las ferredoxinas y la flavodoxina de *Azotobacter*, a las que no se conoce otra función - que la cesión de electrones a la nitrogenasa, hubieran podido subsistir sin ser eliminadas antes de la adquisición de la capacidad fijadora (Dilworth, 1974).

Si la nitrogenasa es, en efecto, un sistema enzimático antiguo y se desarrolló durante la fase de evolución biótica en que el NH_3 era abundante (atmósfera NH_3/CH_4), pudiera darse la paradoja de que su función original no fuera la fijación de nitrógeno, sino la destoxificación del medio en análogos de substratos, tales como cianida o acetileno (Silver y Postgate, 1973). Ahora bien la imposibilidad de determinar las condiciones geoquímicas en que surgió la nitrogenasa da pie a otra hipótesis: el sistema pudo surgir bajo la atmósfera de N_2/CO_2 y, al desarrollarse la atmósfera oxigénica, persistió en los organismos anaeróbios que poseían mecanismos de protección, mecanismos que resultaron favorables en las nuevas condiciones. La irregular e impredecible distribución de la nitrogenasa en los diferentes grupos taxonómicos de microorganismos y la escasez de fijadores anaeróbios avalan esta hipótesis (Postgate, 1974).

Las objeciones en contra del origen ancestral de la nitrogenasa resultan menos convincentes que las pruebas a favor. Se ha interpretado que la similitud del sistema nitrogenasa en todos -- los organismos fijadores podría indicar un origen reciente, pues una larga evolución habría dado oportunidades de diversificación. Sin embargo, existen sistemas enzimáticos de probada antigüedad, como el citocromo C, que no se han diversificado: cuando hay razones funcionales poderosas, la naturaleza es conservadora (véase - Monod, 1970).

Otra objeción se basa en la inexistencia de eucariotas fijadores de nitrógeno; se ha sugerido que la nitrogenasa pudo surgir demasiado tarde para ellos, de manera que la rigidez genética y - la aerobiosis les impidieron adquirir los genes ni₂. Pero también es posible que los predecesores ancestrales de los eucariotas fue ran anaerobios no fijadores o anaerobios que perdieron algunos -- sistemas enzimáticos, quizás la nitrogenasa, al sobrevivir en la atmósfera oxidante.

El registro fósil no proporciona datos importantes respecto a la fijación de nitrógeno. Sin embargo, si el alga fósil Gunflintia minuta poseía heterocistias, la existencia de organismos fijadores podría remontarse a 2.000 millones de años (Dilworth, 1974).

Dentro del mundo bacteriano, la existencia de los genes ni₂ en bacterias coliformes (Klebsiella), que poseen refinados sistemas de transferencia genética, indica la posibilidad de que la fi jación haya sido transferida de unos microorganismos a otros. El carácter promiscuo de algunos plásmidos potencialmente conjugativos, como los factores R de Pseudomonas, acentúa esta posibilidad.

Shanmugam y Valentine (1976) proponen, como hipótesis de -- trabajo, que el segmento ni₂ de Klebsiella puede provenir de otro

microorganismo del suelo. Un estudio comparativo de los mapas de ligamiento de *Klebsiella* y *E. coli* revela una gran homología; concretamente, la región *gnd-his-shiA* de *E. coli* y la homóloga de *Klebsiella* sólo se diferencian en la interposición del operón *nif* entre *his* y *shiA*. Ello da pie a la idea de una inserción.

Por otra parte, el hecho de que los genes *nif* sean fácilmente expresados en *E. coli* y sean regulados, como en *Klebsiella*, por la glutamina-sintetasa autoriza otras consideraciones. Es posible que *E. coli* haya podido adquirir, en algún momento, los genes *nif*; pero dado el escaso valor adaptativo que poseen en el medio natural de este microorganismo, han podido ser eliminados. Desde el punto de vista de la economía celular, las mutaciones y/o deleciones que significan una simplificación del metabolismo pueden resultar ventajosas (Zamenhoff y Eichhorn, 1967).

Origen y evolución de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Aparte de la complejidad del sistema, los planteamientos en torno a la filogenia de la asociación *Rhizobium*-leguminosa encuentran otro obstáculo: no conocemos ningún sistema intermedio entre la estricta simbiosis y las asociaciones laxas. Los nódulos foliares de *Psychotria*, que podrían ser un ejemplo de simbiosis bacteriana intracelular, no son fijadores de nitrógeno (Becking, 1971).

Según la hipótesis de Parker (1957), *Rhizobium* podría proceder de un fijador libre, del que la selección natural ha extraído formas cada vez más dependientes de la planta. La primitiva asociación *Rhizobium*-leguminosa pudo, por tanto, reducirse a una adaptación ecológica, del tipo de las que actualmente establece *Azospirillum brasiliense* (antes *Spirillum lipoferum*, Döbereiner et al. 1973).

La selección pudo hacerse a favor de caracteres tales como la represión de la nitrogenasa en vida libre, la capacidad de invadir el córtex radical y la dificultad de replicación en el citoplasma eucariótico. En la hipótesis de Dilworth y Parker (1969) se llegó a sugerir que *Rhizobium* podía haber depositado en la planta una parte de la información genética necesaria para la fijación. Pero el descubrimiento de la fijación libre y las experiencias de transferencia genética han indicado que estas bacterias poseen la información *ni₂* y que las limitaciones se hallan únicamente a nivel de expresión.

El parentesco taxonómico entre *Rhizobium* y *Agrobacterium* plantea otra posibilidad. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa podría ser el resultado de la atenuación de una relación parasítica. La planta habría conseguido imponer determinadas modificaciones; el control del glutamato sobre la excreción de amonio podría ser una de ellas.

Reijnders (1976), basándose en la descripción de algunas infecciones anómalas de *Rhizobium*, propone que *Rhizobium* y *Agrobacterium* podrían derivar de un antecesor común. La infección a través de lesiones, semejante a la de *Agrobacterium*, reflejaría los primeros estadios de la simbiosis. La infección "normal" en la actualidad, a través de los pelos radicales, que no es común a todas las leguminosas, sería una modificación secundaria, seleccionada bajo la presión de la planta; para ésta, la localización de los nódulos en los puntos más adecuados para la asimilación del amonio liberado posee sin duda un gran valor adaptativo. Reijnders supone que la divergencia entre *Rhizobium* y *Agrobacterium* a partir de un ancestral "Proto-*Rhizobium*" pudo ser consecuencia de la adquisición de un fragmento de ADN, quizás un plásmido, que contuviera los genes *ni₂*.

PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACION

Los progresos realizados en la última década han abierto un gran número de posibles vías de aplicación de la fijación biológica. Postgate (1977) señala las siguientes líneas maestras:

1. Intensificar la explotación de sistemas fijadores ya existentes, tales como las leguminosas exóticas, las asociaciones con no leguminosas de tipo arbustivo, las asociaciones de bacterias fijadoras libres con plantas herbáceas y un mayor uso del "abonado en verde".

2. Aumentar la efectividad de los sistemas existentes, asegurando la expresión de los genes *nif*, alterando los sistemas de control genético para evitar la represión por el nitrógeno fijado, evitando la pérdida de capacidad fijadora por evolución de hidrógeno, modificando la eficiencia de captación de metales especiales como Mo y Fe y/o alterando el comportamiento de la planta en la simbiosis.

3. Construir nuevos sistemas fijadores de nitrógeno, obteniendo híbridos somáticos de plantas de cultivo y plantas naturalmente fijadoras y/o introduciendo los genes *nif* dentro de nuevas razas de microorganismos comensales o simbióticos.

4. Transferir a plantas la capacidad fijadora.

a) construyendo virus ADN o plásmidos transferibles y utilizarlos como vectores para introducir en la planta los genes *nif*.

b) asociando los genes *nif* a ADN de las mitocondrias o los cloroplastos de la planta.

c) intentando que la planta capte como orgánulos potenciales a microorganismos fijadores de nitrógeno.

5. Introducir los genes *nif* en bacterias del rumen y usar microorganismos fijadores de nitrógeno como pienso animal.

Tanto el aislamiento de mutantes nitrogenasa-constitutivos como la obtención de nuevos fijadores parecen objetivos asequibles a corto plazo. A partir de los datos conocidos en *K. pneumoniae*, Shanmugam y Valentine (1975) han sugerido la posibilidad de aislar mutantes *ni₂*-desreprimidos de algas verde-azuladas. Como estos organismos utilizan una fuente de energía ilimitada (la energía solar) constituirían un sistema ideal para la producción de nitrógeno fijado. Ahora bien, recientemente se ha advertido que el incremento de la producción de amonio por microorganismos del suelo y del agua puede representar un peligro ecológico (Nota aparecida en *Science*, 196, 639; 1977). La superproducción de amonio puede provocar descensos en la temperatura, alcalinización del agua y del suelo y contribuir al adelgazamiento de la capa de ozono atmosférico.

La introducción del operón *ni₂* en nuevos huéspedes, aunque en *E. coli* haya sido fácil, puede presentar dificultades. De hecho, la transferencia de los genes *ni₂* a *A. tumefaciens* ha fallado a nivel de la expresión (Dixon *et al.* 1976). Pero además, supuesto que la transferencia indiscriminada del operón *ni₂* fuera posible, convendría actuar con prudencia, en previsión de efectos pleotrópicos inesperados, de tipo patógeno (A.H. Gibson, en el *Symposium de Brookhaven*).

La posibilidad de modificar las características de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, o de extender la capacidad nodulativa de *Rhizobium* a plantas de otras familias parece un objetivo más ambicioso. Quizás las mayores esperanzas puedan derivarse de la obtención de híbridos somáticos de leguminosas y otras plantas (Constabel *et al.* 1975), aunque es difícil prover el comportamiento de los híbridos.

Pero la especulación más sugestiva es, sin duda, el proyecto de construir plantas fijadoras de nitrógeno. En un trabajo re

cientista (Schell y Van Montagu, 1977) se examina detenidamente la posibilidad de utilizar el plásmido TI de *A. tumefaciens* para introducir los genes *nif* en plantas. Por otra parte, las experiencias de Ausubel *et al.* (1977), transfiriendo partes del operón *nif* de *Klebsiella* a un pequeño plásmido amplificable, muestran que la construcción *in vitro* de un plásmido o un virus *nif* es asequible a la ingeniería genética.

Un problema que puede presentarse en cualquier sistema fijador nuevo es la exclusión del oxígeno. Los métodos desarrollados por los sistemas existentes son sin duda el producto de una larga evolución. Es difícil predecir si en algún huésped nuevo podrá existir algún mecanismo, aunque sea inespecífico, de protección de la nitrogenasa. Lo que es evidente es que un ciclo fútil de síntesis y degradación de la enzima no poseería ningún rendimiento.

En cambio, un problema teóricamente grave, la expresión del operón *nif* bacteriano en las células eucarióticas, parece salvable gracias a los recientes progresos de la genética molecular de plantas (véase Ledoux, 1975).

Estas brillantes perspectivas, algunas de las cuales son -- bien próximas a la realidad a pesar de que parezcan rozar la ciencia-ficción, son el fruto de una década de esfuerzos en diferentes comunidades científicas. La urgencia de los problemas sociales que la agricultura debe resolver exige proseguir, o incluso multiplicar, dichos esfuerzos. El reto existe ya; es necesario esperar que la sociedad sepa dar, a tiempo, su respuesta.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Rhizobium meliloti, razas silvestres Rm2, Rm203, Rm402, aisladas de nódulos de raíces de alfalfa en los laboratorios de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín.

R. meliloti, raza Rm4c, curada del plásmido PG por tratamiento con naranja de acridina (Palomares *et al.* 1978). Es resistente al fago AL1 (Corral *et al.* 1978).

R. meliloti, colección de mutantes. Las mutaciones auxotróficas han sido inducidas por tratamiento, simple o secuencial, con Nitro^osoguanidina. Las mutaciones de resistencia a la estreptomycin y rifampicina son de origen espontáneo.

R. meliloti GRC3, lisogénica para el fago AL1, aislada en los laboratorios de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín.

E. coli X193 (Curtiss y Renshaw, 1969).

Pseudomonas aeruginosa PA025 *arg* 10 *leu* (R68.45), proporcionada por B.W. Holloway, Monash University, Clayton (Australia).

Plásmidos

PG de *R. meliloti* (Palomares *et al.* 1978). Codifica la inducción de poligalacturonasa (Olivares *et al.* 1977) y la sensibilidad al fago AL1 (Corral *et al.* 1978).

R68.45 de *P. aeruginosa* (Haas y Holloway, 1976). Confiere resistencia a la ampicilina, neomicina/kanamicina y tetraciclina. Es autotransmisible y puede promover transferencia cromosómica. Pertenec^e al grupo de incompatibilidad P1.

Bacteriófagos

DF2 y AL1, ambos específicos de las razas silvestres de *R. meliloti*. AL1 es incapaz de infectar a las razas curadas del plásmido PG (Corral *et al.* 1978). Han sido proporcionados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de Granada.

T4 de *E. coli*, procedente del Centro de Distribución de Microorganismos de Lausanne.

Planta

Medicago sativa L. (alfalfa).

Medios de cultivo

El medio base utilizado para el aislamiento y conservación de las razas de *Rhizobium* en el laboratorio ha sido el medio 79 de Allen (1951), cuya composición de detalla a continuación:

PO ₄ HK ₂	0.6 g
SO ₄ Mg . 7H ₂ O	0.2 g
CO ₃ Ca	3.0 g
ClNa	0.2 g
Manita	7.6 g
Glucosa	2.4 g
Extracto de levadura (1)	260 ml
Agua corriente	740 ml
Agar(para medio sólido)	17 g
pH	6.8-7.0
Esterilización a 155°C	20 minutos

(1) El extracto de levadura es el filtrado de la mezcla de 250 g de levadura de panadería con dos litros de agua, al cabo de 3 horas de ebullición.

En las experiencias de aislamiento, este medio se usa adicionado de cristal violeta a la concentración 1: 80.000, ya que además de inhibir el crecimiento de hongos y de muchas bacterias Gram-positivas, facilita la identificación de *Rhizobium* en presencia de los posibles contaminantes.

Para el crecimiento de *Rhizobium* en medio líquido se ha utilizado fundamentalmente el medio YGT.

Glucosa	1.5 g
Triptona	0.5 g
Cl ₂ Ca . 2H ₂ O	5 mM
Extracto de levadura .. (Oxoid)	0.25 g
Agua	100 ml
pH	6.5-7.0

Esterilización a 115°C 20 minutos

Como medios mínimos (M-1) se han empleado indistintamente el de Ferry *et al.* (1959) y el de Hooykaas *et al.* (1977) modificado.

Medio de Ferry *et al.*

PO ₄ H ₂ K	2.26 g
PO ₄ HNa ₂ . 12H ₂ O	11.94 g
SO ₄ Fe . 7H ₂ O	0.07 g
SO ₄ Mg . 7H ₂ O	0.19 g
Cl ₂ Ca . 1H ₂ O	0.01 g
Biotina	12 µg

Glucosa	18 g
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	6.6 g
Agua desionizada	1 litro
Agar purificado(BBL)...	17 g
pH	6.5-7.0
Esterilización a 115°C	20 minutos

(1) Conviene esterilizar la glucosa por separado.

Medio de Hooykaas *et al.* modificado.

Manita	10 g
NO_3K	0.6 g
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2^*$	0.4 g
$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	1.0 g
PO_4HK_2	1.0 g
Cl_3Fe	0.01 g
Citrato férrico	10 ml
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 ml
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1 ml
SO_4Zn	0.1 ml
BO_3H_3	0.1 ml
MoO_4Na_2	0.1 ml
Agua desionizada	1 litro
Agar(para medio sólido).	17 g
pH	6.5-7.0

(*). Incluido por nosotros.

Cuando para la preparación de medios selectivos es necesaria la adición al medio mínimo de determinados factores de crecimiento, se preparan soluciones concentradas de los mismos, que se esterilizan por el calor o filtración y se añaden para obtener la concentración final de 1mM/l.

En las experiencias de purificación, enriquecimiento y titulación de fagos de *R. meliloti* se han empleado los medios YSA -- (yeast-sucrose-agar) e YSB (yeast-sucrose-broth) (Vincent, 1970):

Sacarosa	2.5 g
PO ₄ HK ₂	0.5 g
SO ₄ Mg. 7H ₂ O	0.2 g
SO ₄ Ca	0.16 g
ClNa	0.1 g
Cl ₃ Fe	0.02 g
Extracto de levadura ... (Oxoid)	0.5 g
Agua	1 litro
Agar (para YSA)	15 g
pH	6.5-7.0
Esterilización a 115°C	20 minutos

Para la preparación de YSA semiblando, el agar se adiciona a la concentración de 0.7%.

Los cultivos de *E. coli* y *P. aeruginosa* se han llevado a cabo en agar nutritivo y caldo nutritivo (Harrigan y McCance, 1969):

Peptona	10 g
ClNa	5 g
Extracto de carne	3 g

Agua	1 litro
Agar	15 g
pH	7.2
Esterilización a 115°C	20 minutos

En las experiencias de conjugación se ha utilizado como soporte el medio Nutrient Agar (BBL): 2.3 g/100 ml agua.

Antibióticos

Los antibióticos empleados en los diferentes medios selectivos fueron previamente disueltos en agua y esterilizados por filtración (poro de 0.45 μ). Se han usado a las siguientes concentraciones finales (mg/l):

Estreptomina, sulfato (CEPA)	1000
Kanamicina, sulfato (Beecham)	25
Tetraciclina base (ICN)	10
Rifampicina (Sigma)	10
Ampicilina(Beecham)	10

Solución nutritiva

Los cultivos hidropónicos de alfalfa, en los que se han realizado las experiencias de infectividad y las curvas de viabilidad de razas, se han llevado a cabo indistintamente en la solución nutritiva de Hewitt (1952) o en la de Rigaud y Puppo (1975).

Solución de Hewitt:

SO ₄ K ₂	0.30 g
Cl ₂ Ca	1.41 g

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.36 mg
Citrato férrico	0.02 g
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
SO_4Zn	0.003 g
BO_3H_3	0.018 mg
MoO_4Na_2	0.00035 mg
Agua destilada	1 litro

Solución de Rigaud y Puppo:

PO_4HK_2	0.2 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
ClK	0.2 g
$\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.12 g
EDTA FeNa_2	0.025 g
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
Agua destilada	1 litro

Los restantes microelementos se adicionan a las concentraciones descritas para la solución de Hewitt.

Tampón Tris-maleico

La preparación del tampón tris-maleico se ha llevado a cabo según las indicaciones de Jiménez Sánchez (1974).

Solución A: Tris-hidroximetil-aminometano	0.2 M
Acido maleico	0.2 M
Solución B: NaOH	0.2 M

Se mezclan 50 ml de la solución A y 56 ml de la solución B. Se adiciona agua hasta 200 ml y se ajusta el pH a 7.5, si es necesario. El tampón debe esterilizarse por filtración.

Obtención de mutantes auxotróficos de *R. meliloti* por tratamiento con Nitrosoguanidina (NG)

Se ha utilizado la técnica de Cerdá-Olmedo *et al.* (1968), -- adaptada a *R. meliloti*. La concentración óptima de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma) se halla alrededor de 180 µg/ml. El cultivo debe hallarse en fase logarítmica y la densidad debe ser, al menos, de 10^7 células/ml. El cultivo se centrifuga y se lava dos veces con tampón Tris-maleico (pH 7.5) y a continuación se resuspende en la solución de Nitrosoguanidina. Dicha solución, previamente preparada en tampón Tris-maleico, debe guardarse congelada y en la oscuridad hasta el momento de ser usada. El tratamiento se realiza a 28°C, en agitación, durante una hora.

Transcurrido el tiempo de contacto, el cultivo se centrifuga y se lava dos veces con tampón Tris-maleico, con el fin de eliminar la Nitrosoguanidina. El sedimento se resuspende en medio complejo (YGT líquido) y se incuba durante 5-6 horas. Se hace una dilución 1/5 se incuba de nuevo, durante un mínimo de 5-6 horas. Entonces el cultivo es centrifugado en medio mínimo adicionado de penicilina (1000 U/ml), con el fin de eliminar los prototrofos su pervivientes.

Al cabo de 10-12 horas de incubación, el cultivo se centrifuga y se lava con medio mínimo, para eliminar los restos de penicilina. Tras 2-3 lavados, se siembran placas de medio completo - (Medio 79 adicionado cristal violeta).

Esta metodología puede simplificarse considerablemente sin - que ello afecte a la eficacia del tratamiento (Cerdá-Olmedo, co-

municación personal). Los lavados con tampón y el enriquecimiento con penicilina han sido suprimidos. El cultivo en contacto con la Nitrosoguanidina puede ser diluído 1/10 y sembrado directamente - en placas de medio completo.

Aislamiento, purificación y caracterización de los mutantes auxotrofos

Al cabo de 5-7 días de incubación a 28°C, las colonias supervivientes del tratamiento con Nitrosoguanidina son replicadas en dos series de placas (Medio 79 y medio mínimo) para seleccionar - las posibles auxotrofas. Usualmente, las réplicas se han llevado a cabo con palillos estériles. Cuando se lleva a cabo una mutagénesis secuencial, deben añadirse al medio mínimo los nutrientes - cuyo requerimiento ya había sido detectado previamente.

Las colonias supuestamente auxotrofas son purificadas 3-4 veces como garantía de homogeneidad. Cumplido este requisito, se procede a determinar la frecuencia de reversión. De forma rutinaria, se han desechado las razas cuya frecuencia de reversión era superior a 10^{-7} .

La caracterización de las razas auxotróficas se ha llevado a cabo siguiendo el esquema de Holliday (1956).

Selección de mutantes resistentes a antibióticos

Se ha utilizado el medio sólido 79, adicionado de cristal violeta y del antibiótico. En el caso de la estreptomycin, la concentración final adecuada es de 1000 $\mu\text{g/ml}$; en el caso de la rifampicina, 20 $\mu\text{g/ml}$.

Las placas de Petri con el medio apropiado se siembran con una

suspensión densa de la raza elegida de *R. meliloti*. La densidad del cultivo debe ser como mínimo de 1, que corresponde aproximadamente a 2×10^9 células/ml.

La frecuencia de aparición de mutantes naturalmente resistentes se halla entre 10^{-7} y 10^{-9} , pero las frecuencias de reversión suelen ser más bajas. Usualmente, las colonias resistentes aparecen al cabo de 5-7 días de incubación a 28°C.

Enriquecimiento y titulación de las suspensiones de los fagos de *R. meliloti* y *E. coli* que han sido usados

Se han utilizado matraces de 250 ml conteniendo 50 ml del medio adecuado en cada caso (YGT para *R. meliloti* y caldo nutritivo para *E. coli*). Se adiciona simultáneamente 1 ml de suspensión densa de la bacteria específica y 1 ml de la suspensión del fago correspondiente. En todos los casos se ha mantenido un testigo, no inoculado con fago.

Los matraces se incuban en agitación durante 18-24 horas, a 28°C para *Rhizobium* y a 37°C para *E. coli*. Pasado este tiempo, los lisados obtenidos se someten al tratamiento con cloroformo (1%) y posterior centrifugación a 5.000 rpm durante 15 minutos; de esta forma se eliminan las bacterias supervivientes.

Los sobrenadantes se reparten en tubos estériles y se mantienen a 28° a 37°C durante 24 horas; la ausencia de turbidez se toma como garantía de esterilidad. La conservación de las suspensiones de fago se lleva a cabo a 4°C.

Para la titulación de las suspensiones de fago se han seguido las recomendaciones de Winkler *et al.* (1976) y utilizando la técnica de la doble capa (Adams, 1966).

La bacteria y el fago se mezclan en tubos que contienen 3 ml

del medio semiblando apropiado, mantenidos en sobrefusión en un baño termostatzado (45°C). Es conveniente utilizar una serie - de diluciones al décimo de la suspensión de fago. Se inocula 0.1 ml de la dilución de fago correspondiente.

Después de la incubación en condiciones apropiadas (28°C para *R. meliloti*; 37°C para *E. coli*) durante 24-48 horas, se cuenta el número de placas líticas y se calcula el número mínimo de unidades formadoras de placa (Luria, 1940).

Inducción de estirpes lisogénicas de *R. meliloti* con Mitomicina C

La inducción con mitomicina C (Sigma) ha sido usada con varios fines: caracterización de razas lisogénicas, obtención de lisados transductores y estudio de las propiedades de los transductantes.

Se llevaron a cabo experiencias previas para determinar las concentraciones óptimas de Mitomicina C. De los datos obtenidos con la raza *R. meliloti* GRC3 se dedujo que las concentraciones - óptimas para la inducción de las razas lisogénicas de *R. meliloti* son más altas que las requeridas en *E. coli*.

Todas las experiencias de inducción se han llevado a cabo adaptando a *R. meliloti* la técnica descrita por Otsuji *et al.* (1959). Un cultivo de una noche de *R. meliloti* se diluye en medio YGT líquido y se incuba con agitación hasta que alcanza una densidad óptima próxima a 0.3. En ese momento el cultivo es centrifugado y resuspendido en medio YGT adicionado de mitomicina C. Las concentraciones óptimas son 0.3, 0.6 y 1.2 µg/ml. Los cultivos se incuban con agitación y a intervalos regulares (30 minutos, por ejemplo) se miden las densidades ópticas. Conviene añadir un testigo no adicionado de mitomicina C.

Las soluciones de mitomicina C deben prepararse en el acto.

Si se preparan con unas horas de antelación es aconsejable conservarlas congeladas. La esterilización debe llevarse a cabo por filtración; la adición al medio YGT se realiza momentos antes de su utilización.

Cuando interesa aislar la población de fagos liberada, se añade de cloroformo al 2% y se centrifugan los lisados durante 20 minutos a 5.000 rpm. Para mayor seguridad puede usarse la filtración por membrana de 0.45 μ .

Transferencia del factor R68.45 desde *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli*

Para transferir el plásmido R68.45 desde *Pseudomonas aeruginosa* PA025 *arg* 10 *leu* 10 (R68.45) a *E. coli* X193, se ha utilizado la técnica descrita por Jacob *et al.* (1976). Consiste en mezclar 1 ml de un cultivo del donador y 1 ml de un cultivo del receptor, añadir agua destilada estéril hasta 10 ml y retener por filtración en una membrana Millipore de 0.45 μ de tamaño de poro.

Los cultivos deben ser suficientemente densos, conteniendo al menos 10^8 células/ml. Los mejores resultados se obtienen cuando el donador se usa en fase logarítmica y el receptor en fase estacionaria.

Las membranas que contienen la mezcla conjugante se colocan sobre placas de medio NA y se incuban durante 15-18 horas. Pasado ese tiempo, se recoge la mezcla con 10 ml de agua destilada estéril y, previa filtración, se siembra en las placas del medio selectivo correspondiente. En este caso, como el donador es auxotrofo, puede eliminarse usando medio mínimo. A su vez, los receptores no exconjugantes se eliminan adicionando al medio los antibióticos a los que el factor R68.45 confiere resistencia. Por tanto, el medio selectivo utilizado ha sido Medio Mínimo (MM) adi

cionado de Tetraciclina y Kanamicina.

Las frecuencias de transferencia del factor R68.45 de *P. aeruginosa* a *E. coli* se han calculado por donador. Para ello se han llevado a cabo recuentos del número de células viables en los mismos cultivos de donador que se usaron para la conjugación.

Transferencia del factor R68.45 desde *E. coli* a *R. meliloti*

Las experiencias de transferencia del factor R68.45 desde *E. coli* X193 (R68.45) a las razas de *R. meliloti* se han realizado empleando una técnica similar a la descrita en el apartado anterior. Las únicas diferencias se refieren a la eliminación del donador y a la selección de los exconjugantes R^+ de *R. meliloti*.

En todas las experiencias realizadas, la eliminación del donador se ha efectuado por medio del fago T4. Después de resuspender la mezcla conjugante, se añade a la misma 1 ml de una suspensión de alto título de fago T4 y se incuba con agitación durante 30 min, a 37°C. La selección de los exconjugantes *R. meliloti* R^+ se ha llevado a cabo sobre medio 79 adicionado de antibióticos.

El tratamiento con fago T4 elimina la población donadora en más de un 99%. Ello evita considerablemente el peligro de aislar clones mezclados. Sin embargo, para obtener una seguridad absoluta de pureza, los exconjugantes *R. meliloti* R^+ aislados deben ser examinados *a posteriori*, por medio de resiembras. La aparición de colonias de *E. coli*, fácilmente distinguibles por su pronta aparición y por su morfología, indica la existencia de un cultivo mezclado. Con todo, tras 1-2 purificaciones se aislan fácilmente clones puros de *R. meliloti* R^+ .

Las frecuencias de transmisión del Factor R68.45 han sido calculadas sobre la misma base que en apartado anterior.

Transferencia del factor R68.45 entre razas de *R. meliloti*

La transferencia del factor R68.45 entre razas de *R. meliloti* se ha llevado a cabo por medio de la técnica, ya descrita, de conjugación sobre membrana. La selección de los exconjugantes R^+ se ha llevado a cabo sobre el medio selectivo apropiado para cada caso: medio mínimo adicionado de antibióticos y de los requerimientos nutritivos propios de la estirpe receptora.

Transferencia de marcadores cromosómicos mediada por el factor - R68.45 en *R. meliloti*

Los mismos métodos y condiciones que permiten el aislamiento de clones *R. meliloti* R^+ son adecuados para la obtención de recombinantes para marcadores cromosómicos. De acuerdo con las recomendaciones de Beringer *et al.* (1978) y teniendo en cuenta que la inmensa mayoría de los recombinantes son de tipo R^+ , la selección se lleva a cabo en medio adicionado de antibióticos. Aun a costa de pequeños errores en los cálculos de la frecuencia, ello permite eliminar de la mezcla de apareamiento a los revertientes que hubieran podido surgir dentro de la población receptora.

La selección se lleva a cabo para marcadores individuales. Si el receptor es una estirpe múltiple marcada, se adicionan al medio los requerimientos determinados por los alelos mutantes cuya complementación no se desea analizar.

Obviamente, a partir de una única experiencia de conjugación pueden seleccionarse en diferentes medios selectivos los diferentes tipos de recombinantes que puedan haber surgido.

Las frecuencias de transferencia de los diferentes marcadores cromosómicos estudiados se calculan por donador, de la forma descrita anteriormente.

Análisis de los cruces intraespecíficos de *R. meliloti* mediados por el factor R68.45

La selección inicial de los recombinantes cromosómicos se llevó a cabo para marcadores individuales. Los transconjugantes fueron posteriormente estudiados con vistas a determinar el alcance y características de la transferencia cromosómica, de la recombinación y de la haploidización.

Estas experiencias se llevan a cabo replicando las colonias - transconjugantes en los medios selectivos apropiados.

Construcción del mapa de ligamiento de *R. meliloti* 4c

Para determinar las relaciones de ligamiento, las colonias recombinantes para el marcador seleccionado inicialmente fueron replicadas en los medios selectivos correspondientes para determinar la herencia simultánea de los marcadores no seleccionados.

Los porcentajes de herencia simultánea indican las relaciones de ligamiento. Para cada par de marcadores estudiados se han analizado 150-300 colonias. El establecimiento del orden de los genes en el mapa de ligamiento se determinó en cruces de tres factores, según la técnica descrita por Jacob y Wollman (1961).

La representación gráfica del mapa de ligamiento se llevó a cabo suponiendo que los porcentajes de herencia simultánea son directamente proporcionales a las distancias físicas.

Transducción generalizada por el fago DF2

Los lisados transductores fueron preparados mediante la técnica de la doble capa (Adams, 1966) y titulados en medio YSA.

Para la transducción, se adaptó a *R. meliloti* la técnica descrita por Caro y Berg (1971). Un cultivo bacteriano apropiado, - conteniendo alrededor de 10^8 células/ml se mezcla en relación 1:1 con un lisado que contenga 10^8 unidades formadoras de placa (p.f. u.)/ml. La mezcla se incubó con agitación durante 20 minutos a -- 28°C y a continuación se centrifuga para eliminar las partículas de fago no adsorbidas, antes de sembrar el cultivo transducible - en los medios selectivos apropiados.

Se llevaron a cabo controles de esterilidad del fago y de re versión de la raza receptora. Como control suplementario, en las experiencias preliminares se adicionó DNA-asa ($10\ \mu\text{g}/1$) a la mez cla bacteria/fago.

Las frecuencias de transducción se han calculado por unidad formadora de placa.

Estudio de la influencia de la multiplicidad de infección sobre la frecuencia de transducción

Se utilizaron diferentes multiplicidades de infección (m.o.i.), desde 10^{-2} a 10^2 , diluyendo convenientemente una suspensión altamente concentrada de fago (10^{10} p.f.u./ml). Las experiencias de - transducción a diferentes multiplicidades se realizaron de la for ma ya descrita.

Estudio de las propiedades de los transductantes

La estabilidad de los transductantes para el marcador o marca dores transducidos fué examinada por medio de estudios de segrega ción, utilizando los medios selectivos apropiados.

La sensibilidad de los transductantes al fago DF2 fué examina da en medio YSB, en las condiciones más apropiadas para la obten-

tención de un ciclo lítico: la bacteria debe hallarse en fase logarítmica temprana y la multiplicidad de la infección debe ser, - al menos, de 10^3 .

Para Los tests de lisogenia de los transductantes se utilizó mitomicina c (Sigma), de la forma ya descrita.

Análisis cotransduccional

Se ha realizado de la misma forma que los análisis de transferencia simultánea por conjugación. Se lleva a cabo una selección inicial para un solo marcador; los transductantes aislados se examinan posteriormente para determinar si ha habido cotransducción de otros marcadores. Los porcentajes de cotransducción - proceden del análisis de 100-150 clones transductantes en cada - experiencia.

Preparación de plántulas asépticas

Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas de acuerdo con la técnica descrita por Bonnier y Brakel (1969), utilizando Cl_2Hg (Merck) al 2.5%. Tras 8-10 lavados con agua destilada estéril, - las semillas se dejan en imbibición durante 5-6 horas.

La germinación se lleva a cabo en placas Petri. Al final del período de imbibición, las semillas son trasladadas en condiciones asépticas a placas Petri que contienen un círculo de papel - de filtro humedecido con 3 ml de agua estéril. Las placas se colocan a $28^{\circ}C$, en la oscuridad, durante 36-40 horas.

Cultivo hidropónico de plantas asépticas de alfalfa

Se ha empleado la técnica descrita por Olivares (1964). Una

vez que las plántulas han alcanzado 1-2 cm de longitud, son trasladadas en condiciones de esterilidad a tubos 20 x 200 (5 plántulas por tubo) que contienen 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Es aconsejable quitar previamente los restos de la cubierta, usando unas pinzas flameadas.

La mitad inferior de los tubos debe recubrirse con papel mate de color oscuro, para evitar la luz directa sobre las raíces. Los tubos se colocan en una cámara termostatzada (25°C) y convenientemente iluminada (16 horas de luz/8 de oscuridad). Al cabo de 20-25 días, las plantas se hallan en condiciones de ser inoculadas.

Medida del grado de infectividad de diferentes razas de *R. meliloti*

Se ha empleado la técnica de Olivares *et al.* (1978), basada en la adición de tetraciclina. Para determinar el grado de infectividad de una raza, se inoculan dos series de tubos. La concentración bacteriana en la solución nutritiva debe ser aproximadamente de - 100.000 cel/ml. Pasadas 48 horas, una de las series de tubos es - adicionada de tetraciclina (Tc), en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 10 µg/ml. En determinadas circunstancias, el tiempo de adición de tetraciclina fue retrasado a las 72 ó 96 horas para obtener datos comparativos de razas poco infectivas. El tamaño de las muestras ha sido, usualmente, de 10 tubos (50 plantas) por serie.

La determinación del coeficiente de infectividad se obtiene - según la fórmula

$$C_i = \frac{N_{Tc}}{N} \times 100$$

siendo N_{Tc} el número de nódulos producidos en presencia de Tetra

ciclina y N el número de nódulos producidos en los tubos sin anti-biótico.

Para la comparación del grado de infectividad de diferentes -mutantes, se ha tomado como $G_i = 100$ el coeficiente de infectividad de la raza silvestre.

Medida de la efectividad de diferentes razas de *R. meliloti*

Para conocer la actividad nitrogenasa de las diferentes razas de *R. meliloti* estudiadas, se ha utilizado la técnica de reducción de acetileno a etileno (Koch y Evans, 1966).

Las medidas son llevadas a cabo utilizando nódulos intactos. Después de cortar las raíces en las zonas adyacentes, los nódulos son colocados en tubos de vidrio, a los que se añade una gota de agua para conservar la humedad, siendo posteriormente cerrados con tapones de rosca provistos de un orificio y un círculo de silicona que permite el cierre hermético y la introducción de la aguja de la jeringa para la toma de muestras de la atmosfera interna. Después de hacer el vacío en el interior de los tubos, se introduce en los mismos la mezcla de gases adecuada:

Argón 70%

Oxígeno 20%

Acetileno 10%

La determinación de la producción de etileno se llevó a cabo por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Perkin-Elmer F7 equipado con un detector de ionización de llama, con una columna de alúmina de 80 mesh, 45 cm de longitud y 1.75 mm de diámetro interior, a la temperatura de 100°C. Como gas portador se ha utilizado nitrógeno a un flujo de 80 ml/minuto. Rutinariamente, las medidas se hacen a tiempo 0 y 30 minutos, inyectando 100 μ l

de cada muestra-problema. La actividad específica de nitrogenasa se calcula como $\mu\text{moles de } \text{C}_2\text{H}_2/\text{mg de peso seco de nódulos/hora}$.

Reaislamiento de razas de *R. meliloti* a partir de nódulos

Cuando se ha juzgado necesario, se ha procedido a identificar las razas formadoras de nódulos. Para ello se esterilizan su superficialmente con solución de Cl_2Hg al 0.25% durante 5 minutos, lavando varias veces con agua destilada estéril.

Los nódulos se colocan en una placa Petri, a la que se añaden 2-3 gotas de agua destilada estéril y se aplastan con una varilla de vidrio flameada. Con un asa, se toma una pequeña cantidad del jugo resultante y se siembra en estría sobre una placa de medio 79 de Allen adicionado de cristal violeta. Una vez han crecido las colonias, puede estudiarse su genotipo por las réplicas usuales sobre medios selectivos.

Viabilidad de las razas de *R. meliloti* en la solución nutritiva

Los estudios en este sentido se han llevado a cabo indistintamente en la solución de Hewitt o en la de Rigaud y Puppo, siempre en presencia de la planta.

Los tubos correspondientes fueron inoculados con 100.000 cel/ml. Cada 24 horas se extrajo una alícuota y se procedió a realizar recuentos del número de células viables. Se han llevado a cabo recuentos comparativos en series de tubos inoculados con células lavadas frente a otras series en que no se tomó tal precaución.

Asímismo, se han estudiado las curvas de viabilidad de diferentes mutantes auxotróficos según que se añadieran o no los requerimientos nutritivos de dichos mutantes.

Curvas de crecimiento de diferentes razas de *R. meliloti*

Se ha seguido la técnica usual, utilizando varios matraces - inoculados con la misma cantidad de células (100.000) y extrayendo 1 ml cada 2 horas. Los cultivos se han llevado a cabo en medio YGT, enriquecido o no con los factores de crecimiento requeridos por las razas auxotróficas empleadas.

Los recuentos se han realizado en medio 79 de Allen adicionado de cristal violeta.

Obtención de polisacáridos extracelulares de *R. meliloti*

Se ha utilizado la técnica descrita por Palomares (1975). Un cultivo de nueve días en medio 79 de Allen se centrifuga a 5000 rpm durante 30 minutos. Se adicionan dos volúmenes de acetona al sobrenadante. El precipitado se lava con acetona y se seca con aire caliente (40-50°C).

Utilización de los polisacáridos en los ensayos de infectividad

Las soluciones de polisacáridos, previamente tyndalizadas o esterilizadas al autoclave, se adicionan al cultivo hidropónico simultáneamente a la inoculación de forma que se obtenga una concentración final de 1 mg/ml.

RESULTADOS Y DISCUSION

EXPERIENCIAS DE CONJUGACION Y TRANSDUCCION. CONSTRUCCION DEL MAPA CIRCULAR DE LIGAMIENTO DE *Rizobium meliloti* 4c

Los microorganismos y bacteriófagos utilizados en estas experiencias ya han sido reseñados. Las razas derivadas de *R. meliloti* 4c que han servido para la construcción del mapa circular de ligamiento se relacionan en la Tabla 5.

Transferencia del Factor R68.45 de *P. aeruginosa* a *E. coli*.

Aunque el Factor R68.45 es directamente transmisible desde *P. aeruginosa* a *R. meliloti*, en las experiencias iniciales se obtuvieron frecuencias relativamente bajas (alrededor de 10^{-4}), mientras que la transferencia a *E. coli* se realiza a frecuencias mayores de 10^{-2} . Este hecho debe atribuirse a que *R. meliloti* 4c es más sensible que *E. coli* X193 a las sustancias antimicrobianas producidas por *P. aeruginosa*. En consecuencia, se usó *E. coli* como intermedio de la transferencia.

La técnica de conjugación en membrana permite obtener frecuencias de transmisión de $3-8 \times 10^{-1}$ por célula donadora, mucho mayores que las obtenidas por conjugación en medio sólido (alrededor de 10^{-4}). Como el donador es auxotrófico, la selección de los exconjugantes *E. coli* R⁺ resulta muy fácil, sobre medio mínimo adicionado de antibióticos (Kan, Tc, Amp).

Transferencia del factor R68.45 de *E. coli* a *R. meliloti*

La introducción del factor R68.45 en *R. meliloti* se ha lleva

Tabla 5

Razas derivadas de *R. meliloti* 4c utilizadas para la construcción del mapa cromosómico de ligamiento

<u>Razas</u>	<u>Características principales</u>
GRC 18	<i>ala1 ser1</i>
GRC 18.1	<i>ala1 ser1 str</i>
GRC 30	<i>ilv3 his29</i>
GRC 50	<i>orn1</i>
GRC 51	<i>arg17 phe15</i>
GRC 51.2	<i>arg17 phe15 str rif</i>
GRC 54	<i>cys4 thi1</i>
GRC 54.2	<i>cys4 thi1 str rif</i>
GRC 55	<i>leu5 his31 lys25</i>
GRC 56	<i>ade9 met1 ura2</i>
GRC 56.1	<i>ade9 met1 ura2 str</i>
GRC 59	<i>ade3 arg17</i>
GRC 61	<i>leu5 ade1</i>
GRC 38	<i>ala1 ser1 gly10</i>
GRCX 1	<i>leu5 gly10 str</i>
GRCX 2	<i>ala1 lys25 str</i>
GRCX 6	<i>ura2 ala1</i>

Para los símbolos de genes se ha utilizado la nomenclatura propuesta por Demerec *et al.* (1966).

Los números de los alelos son arbitrarios. Para los marcadores *str* y *rif* han sido suprimidos, debido a que todos los alelos fueron mapeados en la misma región.

Las estirpes GRCX1 y GRCX2 proceden de un cruce GRC55 x GRC38. La estirpe GRCX6 procede de un cruce GRC56 x GRC38.

vado a cabo desde *E. coli* X193 (R68.45). La contraselección de *E. coli* por medio del fago T4 simplifica el aislamiento de los exconjugantes *R. meliloti* R⁺ y disminuye en un 99% el peligro de aislar clones contaminados con células donadoras.

De todos modos, la pureza de los clones de *R. meliloti* R⁺ debe comprobarse mediante diseminación en placa. La práctica ha demostrado que esta precaución suplementaria se halla plenamente justificada: en algunos casos, en las placas donde se diseminaron clones exconjugantes, aparecieron colonias de *E. coli*. Normalmente, una segunda purificación fue suficiente para aislar con garantía absoluta un clon *R. meliloti* R⁺.

Las frecuencias de transmisión del Factor R68.45 desde *E. coli* a *R. meliloti* oscilaron, en diferentes experiencias, entre $4-9 \times 10^{-1}$.

Estabilidad del Factor R68.45 dentro de *R. meliloti* 4c

En su huésped original, *Pseudomonas aeruginosa*, el Factor R68.45 posee gran estabilidad y la pérdida del plásmido completo ocurre con una frecuencia de 10^{-6} , aproximadamente (Haas y Holloway, 1976). Sin embargo, la capacidad de R68.45 para movilizar cromosoma es relativamente inestable y se pierde con una frecuencia de un 3-8% (Haas y Holloway, 1976). En nuestro laboratorio se están llevando a cabo estudios similares en *R. meliloti*. Por el momento, los datos disponibles indican que el comportamiento del Factor R68.45 dentro de *R. meliloti* no difiere en gran medida del que manifiesta en su huésped original, aunque las frecuencias de pérdida total o parcial pueden diferir en 1-2 grados de magnitud.

Para eliminar los eventuales segregantes R⁻, la conservación de *R. meliloti* R⁺ se ha llevado a cabo en medio adicionado de los

antibióticos a los que el Factor R68.45 confiere resistencia. El carácter Cda^+ no es seleccionable *in vitro*, por lo que los segregantes Cda^- sólo pueden ser desechados *a posteriori*.

Transferencia intraespecífica del Factor R68.45 y movilización de cromosoma en *R. meliloti* 4c

La transferencia del Factor R68.45 en *R. meliloti* no presenta ningún problema. La frecuencia de transmisión se halla siempre alrededor de 10^{-2} , por donador.

La transferencia de marcadores cromosómicos es fácilmente detectable. Todos los marcadores estudiados poseen aproximadamente la misma probabilidad de ser transferidos: alrededor de 10^{-5} . Teniendo en cuenta que todos los marcadores utilizados poseen una frecuencia de reversión a 10^{-8} , las frecuencias de transferencia cromosómica ofrecen una confianza absoluta.

En la Tabla 6 se ofrecen algunos ejemplos de transferencia intraespecífica del Factor R68.45 y de arrastre de marcadores cromosómicos. Los resultados se hallan de acuerdo con los obtenidos por Kondorosi *et al.* (1977).

Análisis de los cruces intraespecíficos de *R. meliloti* 4c mediados por el factor R68.45

Algunas características importantes de los cruces mediados por el factor R68.45 pueden ser establecidos a partir del análisis de las poblaciones transconjugantes.

Para ello es necesario aislar un número suficientemente alto de clones transconjugantes y estudiar *a posteriori* su genotipo. Este tipo de análisis proporciona datos acerca de las siguientes cuestiones:

Tabla 6

Transferencia del Factor R68.45 y movilización de cromosoma en *R. meliloti* 4c

<u>Donador (R⁺)</u>	<u>Receptor</u>	<u>Frec.transmisión R68.45</u>	<u>Marcador contraseleccionado</u>	<u>Marcador seleccionado</u>	<u>Frecuencia recombinantes</u>
GRC 51.2	GRC 55	9.1×10^{-2}	<i>arg15</i>	<i>leu5⁺</i>	2.2×10^{-5}
				<i>lys25⁺</i>	8.8×10^{-4}
				<i>his31⁺</i>	8.2×10^{-4}
				<i>str</i>	2.1×10^{-5}
				<i>rib</i>	2.7×10^{-5}
GRC 54.2	GRC 59	1.5×10^{-2}	<i>cys4</i>	<i>ade3⁺</i>	9.4×10^{-4}
GRC 18.1	GRC 30	8.8×10^{-2}	<i>ala1</i>	<i>arg17⁺</i>	7.5×10^{-4}
				<i>ilv3⁺</i>	3.0×10^{-5}
GRC 61	GRC 18	1.1×10^{-2}	<i>leu5</i>	<i>his29⁺</i>	1.1×10^{-5}
				<i>ser1⁺</i>	2.6×10^{-5}
				<i>gly1⁺</i>	8.6×10^{-4}

Las frecuencias de transmisión del Factor R68.45 fueron calculadas como frecuencia de exconjugantes Tc^r por bacteria donadora. Las frecuencias de recombinación se calcularon sobre la misma base.

1. Alcance de la transferencia cromosómica

El uso de las razas receptoras que llevan varios alelos mutantes permite estudiar si existen limitaciones en la longitud de los segmentos cromosómicos transferidos. Obviamente, si se pudieran detectar clones transconjugantes que hubieran recibido múltiples alelos del donador, ello indicaría la posibilidad de transferencia de grandes longitudes de cromosoma o incluso, del cromosoma entero.

La técnica de conjugación sobre membrana es especialmente adecuada para este tipo de estudios, puesto que garantiza el contacto de los pares conjugantes. El tiempo de conjugación debe ser suficientemente largo (18-24 horas). El donador y el receptor deben usarse en proporción 1:1, para evitar eventuales riesgos de zigosis letal.

Como puede observarse en la Tabla 7, la conjugación exhaustiva sólo permite obtener algunos tipos de recombinantes múltiples. Ello constituye un indicio de que existen limitaciones en el tamaño de los segmentos cromosómicos que el Factor R68.45 puede arrastrar. Obviamente, la aparición de algunos tipos de recombinantes múltiples sugiere que los marcadores implicados puedan estar relativamente ligados; todo ello se confirmó posteriormente.

Los datos reseñados en la Tabla 8 corresponden al análisis completo de una población transconjugante. Puede observarse que cada tipo de recombinantes aparece con una frecuencia relativamente definida y que algunas clases de recombinantes están siempre ausentes.

Ello confirma definitivamente que la longitud de los segmentos cromosómicos transferidos es limitada. Por consiguiente, cabe esperar que aquellos marcadores que se hallen muy alejados entre sí nunca podrán ser cotransferidos en un mismo cruce. Inversamente, la frecuencia de aparición de cada tipo de recombinantes indicará

Tabla 7

Transferencia simultánea de diferentes marcadores de *R. meliloti* 4c en un solo cruce
mediado por el Factor R68.45

<u>Donador (R⁺)</u>	<u>Receptor</u>	<u>Marcador seleccionado</u>	<u>Genotipo recombi- nante múltiple</u>	<u>% de recombinantes múltiples</u>
GRC56.1	GRC18	<i>ala1</i> ⁺	<i>ala1</i> ⁺ <i>ser1</i> ⁺ <i>str</i>	1
GRC51.2	GRC56	<i>ade9</i> ⁺	<i>ade9</i> ⁺ <i>met1</i> ⁺ <i>ura2</i> ⁺	0
		<i>met4</i> ⁺	<i>met4</i> ⁺ <i>ura2</i> ⁺ <i>str</i>	0
GRC51.2	GRC30	<i>ilv3</i> ⁺	<i>ilv3</i> ⁺ <i>his29</i> ⁺ <i>str</i>	25
GRC51.2	GRC55	<i>leu5</i> ⁺	<i>leu5</i> ⁺ <i>lys25</i> ⁺ <i>rif</i>	0
		<i>lys25</i> ⁺	<i>lys25</i> ⁺ <i>his31</i> ⁺ <i>leu5</i> ⁺	11
			<i>lys25</i> ⁺ <i>his31</i> ⁺ <i>str</i>	0
GRC54.2	GRC61	<i>ade1</i> ⁺	<i>ade1</i> ⁺ <i>leu5</i> ⁺ <i>rif</i>	0
			<i>ade1</i> ⁺ <i>leu5</i> ⁺ <i>str</i>	0

Los porcentajes de transferencia múltiple proceden del análisis de 150-300 clones seleccionados para un sólo marcador.

el grado de ligamiento.

2. Alcance de la recombinación y de la haplodización

Como puede observarse en la Tabla 8, en los recombinantes pueden ser indistintamente expresados alelos silvestres o mutantes procedentes del donador. Ello sugiere que los transconjugantes son haploides, producidos tras los correspondientes entrecruzamientos ("crossing over"). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Meade y Signer (1977) usando el Factor RP4 y con los de Beringer *et al.* (1978) en *R. leguminosarum* /R68.45.

Una comprobación adicional ha sido obtenida por medio de las pruebas de segregación. Ninguno de los clones transconjugantes examinados segregaba total o parcialmente el tipo parental. Por tanto, estos cruces no producen merodiploides estables; los transconjugantes son haploides verdaderos.

Sin embargo, la recombinación presenta una característica singular, que ya ha sido descrita por otros autores (Meade y Signer, 1977; Beringer, 1978): la tendencia a integrar segmentos enteros de cromosoma, sin recombinación interior, como si los extremos del fragmento transferido fueran cohesivos ("end effects", según la denominación de Beringer *et al.* 1978). Ello determina que, en ciertos casos, los transconjugantes reciban obligatoriamente determinados alelos mutantes del donador. Por ejemplo, en un cruce GRC56 x GRC55, un 97% de los recombinantes *his31⁺ lys25⁺* habían recibido el marcador *met1*. Este fenómeno es la causa de que, aparentemente, algunos cruces no produzcan recombinantes. En estos casos, la selección debe llevarse a cabo en diferentes series de medios, a cada uno de los cuales se adiciona un requerimiento nutritivo del donador. Resulta entonces muy fácil descu

brir cual es el alelo mutante intercalado en el segmento cromosómico recombinado por los transconjugantes seleccionados.

De esta forma, un hecho que en principio constituye un problema con vistas a los análisis de ligamiento puede proporcionar sugerencias acerca de la localización relativa de determinados genes. En el caso anteriormente citado, se supuso que el gen *met1* se hallaba entre *leu5* y *lys25*, hipótesis que fue confirmada posteriormente.

Todas las experiencias en las que se han presentado hechos de este tipo han sido aprovechadas como sugerencias, pero no han sido utilizadas para los análisis de ligamiento. La recepción de alelos mutantes puede plantear problemas a efectos de una segura contraselección del donador.

3. Características de la transferencia cromosómica.

Todos los marcadores estudiados poseen aproximadamente la misma probabilidad de ser transferidos (véase la Tabla 6). Ello indica que el Factor R68.45 es capaz de promover transferencia cromosómica desde múltiples puntos.

Este hecho, que es común a todos los factores R del grupo P1, y a muchos otros factores R, debe atribuirse a la existencia de secuencias complejas de inserción, del tipo denominado *Tn* (Transposones) según la nomenclatura propuesta por Campbell *et al.* (1977).

En la Tabla 9 se exponen los análisis de dos poblaciones transconjugantes desde el punto de vista del carácter R^+/R^- . Puede observarse que los recombinantes cromosómicos son mayoritariamente de tipo R^+ . Ello parece indicar que la transferencia no se ajusta al modelo Hfr (véase Adelberg y Pittard, 1965), sino que -

Tabla 8

Análisis de un cruce mediado por el Factor R68.45 en *R. meliloti* 4c: GRC56.1 *ade9 ura2 met1 str* (R68.45) x GRC18 *ala1 ser1*

<u>Marcador contraseleccionado</u>	<u>Marcador seleccionado</u>	<u>Clases de recombinantes no seleccionados</u>	<u>Número</u>	<u>%</u>
<i>ade9</i>	<i>ala1⁺</i>	<i>ser1⁺ ura2</i>	0	-
		<i>ser1 ura2</i>	10	6.5
		<i>ser1⁺ met1</i>	0	-
		<i>ser1 met1</i>	1	0.6
		<i>ser1⁺ str</i>	0	-
		<i>ser1 str</i>	5	3.2
		<i>ser1</i>	136	89.5
			<hr/>	152
<i>ade9</i>	<i>ser1⁺</i>	<i>ala1⁺ ura2</i>	0	-
		<i>ala1 ura2</i>	1	0.6
		<i>ala1⁺ met1</i>	0	-
		<i>ala1 met1</i>	0	-
		<i>ala1⁺ str</i>	1	0.6
		<i>ala1 str</i>	4	2.6
		<i>ala1</i>	146	96.2
	<hr/>	152	100	

<u>Marcador contraseleccionado</u>	<u>Marcador seleccionado</u>	<u>Clases de recombinantes no seleccionados</u>	<u>Número</u>	<u>%</u>
<i>ade9</i>	<i>str</i>	<i>ser1⁺ ala1⁺</i>	0	-
		<i>ser1⁺ ala1</i>	1	0.6
		<i>ser1 ala1⁺</i>	4	2.8
		<i>ser1⁺ ura2</i>	0	-
		<i>ser1 ura2</i>	0	-
		<i>ala1⁺ ura2</i>	0	-
		<i>ala1 ura2</i>	0	-
		<i>ser1⁺ met1</i>	0	-
		<i>ser1 met1</i>	0	-
		<i>ala1⁺ met1</i>	0	-
		<i>ala1 met1</i>	0	-
		<i>ser1 ala1</i>	147	96.6
			<hr/> 152	<hr/> 100

La selección inicial se llevó a cabo sembrando las mezclas de apareamiento sobre medios selectivos adicionados de los requerimientos no contraseleccionados del donador. Ello permite el crecimiento de los transconjugantes que hayan recibido alelos mutantes del donador. La caracterización para los marcadores no seleccionados se llevó a cabo replicando las colonias en los medios apropiados para la selección de cada tipo de recombinantes.

Tabla 9

Incidencia del carácter R⁻ en tres poblaciones transconjugantes

Cruce: GRC55 x GRC38

Genotipo recombinante seleccionado: *leu5 gly10*

Núm. recombinantes analizados	121
R ⁺	119
R ⁻	2
% R ⁻	2%

Cruce: GRC55 x GRC 38

Genotipo recombinante seleccionado: *ala1 lys25*

Núm. recombinantes analizados	78
R ⁺	77
R ⁻	1
% R ⁻	1%

Cruce: GRC56 x GRC38

Genotipo recombinante seleccionado: *ura2 ala1*

Núm. recombinantes analizados	152
R ⁺	150
R ⁻	2
% R ⁻	1%

Estas determinaciones se llevaron a cabo replicando sobre medios con y sin Tetraciclina las colonias recombinantes previamente seleccionadas.

la transferencia del factor R completo precede a la de los marcadores cromosómicos.

La aparición de recombinantes cromosómicos R^- a frecuencias muy alejadas de las de reversión espontánea indica que, -- ocasionalmente, podrían existir variantes "*Hfr-like*" en la transferencia. Este hecho ya ha sido descrito por Meade y Signer (1977) para el Factor RP4 y por Beringer *et al.* (1978) para el Factor -R68.45.

Construcción del mapa cromosómico de ligamiento de *R. meliloti* 4c por conjugación mediada por el Factor R68.45

Aunque se tuvieron en cuenta las sugerencias proporcionadas por experiencias del tipo descrito en las Tablas 8 y 9, en las que se detectó transferencia de alelos mutantes, los análisis rutinarios de ligamiento se llevaron a cabo a partir de los datos de transferencia de alelos silvestres y de resistencia a antibióticos. Se han seguido, pues, los métodos clásicos de construcción de mapas (véase Taylor y Adelberg, 1961; Taylor y Trotter, 1967; Hayes, 1968; Carlberg, 1976).

En la Tabla 10 se relacionan los porcentajes de ligamiento de una serie de pares de marcadores. Dichos porcentajes son medias aritméticas de los obtenidos en diferentes cruces. En cada cruce se han analizado rutinariamente 152 colonias para cada par de marcadores.

Algunos porcentajes de ligamiento varían significativamente de un cruce a otro, lo cual debe atribuirse a que los segmentos cromosómicos transferidos poseen un tamaño variable. Ello -- coincide con las apreciaciones de otros autores (véase Beringer *et al.* 1978). Para clarificar los resultados ambiguos se ha duplicado el número de colonias analizado.

Tabla 10

Análisis del ligamiento de varios pares de marcadores
de *R. meliloti* 4c

<u>Donador</u>	<u>Receptor</u>	<u>Pares de marcadores</u>		<u>Ligamiento(%)</u>
GRC54.2	GRC51	<i>arg17</i> ⁺	<i>phe15</i> ⁺	71
GRC51.2	GRC55	<i>leu5</i> ⁺	<i>his31</i> ⁺	31
		<i>leu5</i> ⁺	<i>lys25</i> ⁺	10
		<i>his31</i> ⁺	<i>lys25</i> ⁺	18
GRC51.2	GRC56	<i>ade9</i> ⁺	<i>str</i>	21
		<i>ade9</i> ⁺	<i>rib</i>	22
		<i>met4</i> ⁺	<i>ura2</i> ⁺	13
		<i>rib</i>	<i>str</i>	95
GRC54.2	GRC59	<i>ade3</i> ⁺	<i>arg17</i> ⁺	2
		<i>ade3</i> ⁺	<i>str</i>	30
GRC51.2	GRC18	<i>ala1</i> ⁺	<i>str</i>	4
		<i>ala1</i> ⁺	<i>rib</i>	5
GRC51.2	GRC18.1	<i>ser1</i> ⁺	<i>gly1</i> ⁺	68
GRC51.2	GRC30	<i>ilv3</i> ⁺	<i>his29</i> ⁺	72
		<i>ilv3</i> ⁺	<i>str</i>	20
		<i>his29</i> ⁺	<i>str</i>	26
		<i>ilv3</i> ⁺	<i>rib</i>	11
		<i>his29</i> ⁺	<i>rib</i>	18
GRC51.2	GRC50	<i>orn1</i> ⁺	<i>str</i>	91
		<i>orn1</i> ⁺	<i>rib</i>	89
		<i>str</i>	<i>rib</i>	99
GRC51.2	GRC54	<i>cys4</i> ⁺	<i>rib</i>	10
GRC54.2	GRC61	<i>leu5</i> ⁺	<i>ade1</i> ⁺	5
GRC50	GRCX1	<i>ala1</i> ⁺	<i>lys25</i> ⁺	11
GRC54.2	GRCX1	<i>ala1</i> ⁺	<i>rib</i>	5
GRC50	GRCX2	<i>leu5</i> ⁺	<i>gly10</i> ⁺	7
GRC50	GRCX6	<i>ala1</i> ⁺	<i>ura2</i> ⁺	7

En la Tabla se omiten los resultados inferiores a un 2%.

Figura 1

Grupos provisionales de ligamiento determinados a partir de los datos de conjugación mediada por R68.45

Grupo 1:

his31 met1 lys25
leu5 his31 lys25
met1 ura2 ade1
ura2 ade1 ala1
leu5 met1 lys25 ala1 his29
ilv3 his29

Grupos 2:

rif str orn1
ala1 rif str
ilv3 rif str
his29 rif
str ade3 ade9
rif orn1 ade9

Grupo 3:

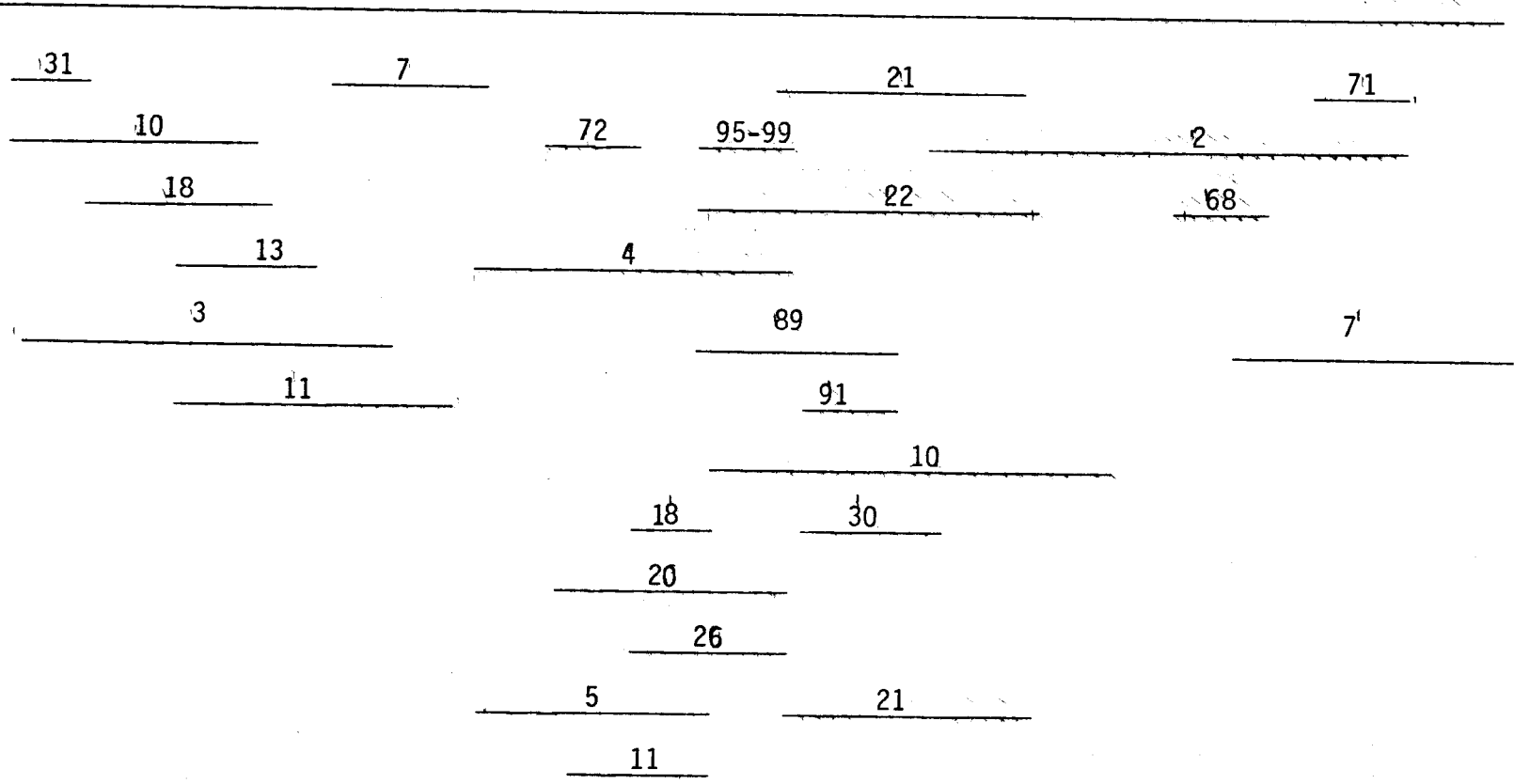
ade3 cys4 arg17
phe15 arg17
cys4 ser1 gly10
gly10 leu5

La delimitación de tres grupos de ligamiento es arbitraria. Supone únicamente un artificio útil para la construcción del puzle cromosómico; no refleja, tanto, ningún límite real de la transferencia mediada por R68.45.

Figura 2

Mapa preliminar de ligamiento de *Rhizobium meliloti*. 4c

5 31 1 25 2 1 1 3 29 1 3 9 4 1 10 15 17 5
 leu his met lys ura ade ala ilv his rif str orn ade ade cys ser gly phe arg leu



El establecimiento del orden de los genes estudiados se -- llevó a cabo confeccionando los pequeños segmentos de la Figura 1, en los que se observan las relaciones entre distintos genes. Para ello se tuvieron en cuenta los datos de ligamiento (Tabla - 10), la ausencia de ligamiento y las sugerencias proporcionadas por la transferencia de alelos mutantes.

Los segmentos de la Figura 1 se interrelacionan unos con - otros como las piezas de un "puzzle" (véase la Figura 2). Obsér- vese que el número de marcadores utilizados ha sido suficiente - para poner en evidencia la circularidad del cromosoma.

En los cruces destinados a proporcionar datos de ligamien- to se han utilizado preferentemenete razas receptoras vírgenes. Sin embargo, el mapeo de ciertas regiones ha sido facilitado gra- cias al uso de transconjugantes R^- aislados a partir de las expe riencias descritas en la Tabla 9. Tales son las estirpes GRCX1, GRCX2 y GRCX6. En los tres casos se comprobó fehacientemente tan- to el carácter R^- como la naturaleza haploide de dichas razas.

Rutinariamente, la selección de recombinantes simples se - ha llevado a cabo sobre medios adicionados de los antibióticos - a los que el factor R68.45 confiere resistencia. Ello implica la eliminación de los recombinantes minoritarios R^- , pero asegura - la eliminación de los revertientes que hubieran podido desarro- llarse dentro de la población receptora. Se ha considerado que - un error de 1-2% era despreciable al lado de los riesgos de rever- sión; la misma precaución ha sido tomada en cuenta por Beringer *et al.* (1978).

Transducción de marcadores de *R. meliloti* 4c por el fago DF2

En las experiencias de transducción se ha utilizado el fago DF2.1, un mutante atenuado aparecido espontáneamente a partir de

Tabla 11

Transducción de algunos marcadores de *R. meliloti* 4c por el fago DF2.1

<u>Marcador transducido</u>	<u>Frecuencia/ p.f.u</u>
<i>leu5</i> ⁺	2.3 x 10 ⁻⁶
<i>phe15</i> ⁺	4.5 x 10 ⁻⁶
R68.45 (Tc ^r)	2.5 x 10 ⁻⁷
<i>str</i>	8.1 x 10 ⁻⁷
<i>rif</i>	7.0 x 10 ⁻⁷
<i>his29</i> ⁺	6.1 x 10 ⁻⁷
<i>ilv3</i> ⁺	1.2 x 10 ⁻⁶
<i>arg17</i> ⁺	7.7 x 10 ⁻⁷
<i>ser17</i> ⁺	4.4 x 10 ⁻⁷
<i>gly10</i> ⁺	4.4 x 10 ⁻⁷
<i>orn1</i> ⁺	1.2 x 10 ⁻⁷

Las frecuencias dadas son la media aritmética de las obtenidas en diferentes experiencias. No se ha observado variación significativa cuando se usaron como donadoras razas diferentes. Se ha verificado la ausencia de transducción efectiva en los cruces homólogos.

una población de la variedad virulenta DF2 (Corral *et al.* 1978). La variedad DF2.1 debe clasificarse dentro del tipo moderado-virulento, puesto que su comportamiento depende de las condiciones en que tiene lugar la infección: cuando la bacteria susceptible se halla en fase logarítmica temprana, el fago DF2.1 es capaz de lisar absolutamente el cultivo; a medida que se retrasa el momento de la infección, la capacidad lítica va disminuyendo. El hecho de que el comportamiento de un fago dependa del ciclo celular bacteriano ya ha sido observado en *B. subtilis* (L.J. Archer, comunicación personal). El comportamiento del fago DF2.1 también depende de la multiplicidad de la infección.

Resulta relativamente fácil poner en evidencia la transducción de marcadores de *R. meliloti* 4c por el fago DF2.1, si el cultivo bacteriano receptor se halla en fase estacionaria y se usa una multiplicidad de infección (m.o.i.) adecuada. En la Tabla 11 se relacionan las frecuencias de transducción obtenidas para diferentes marcadores, cromosómicos o no. Puede observarse que todos los marcadores estudiados poseen una probabilidad similar de ser transducidos: alrededor de 10^{-7} . La frecuencia de transducción es afectada por la multiplicidad de infección (véase la Gráfica 1). Las frecuencias más altas se obtienen cuando m.o.i.=1.

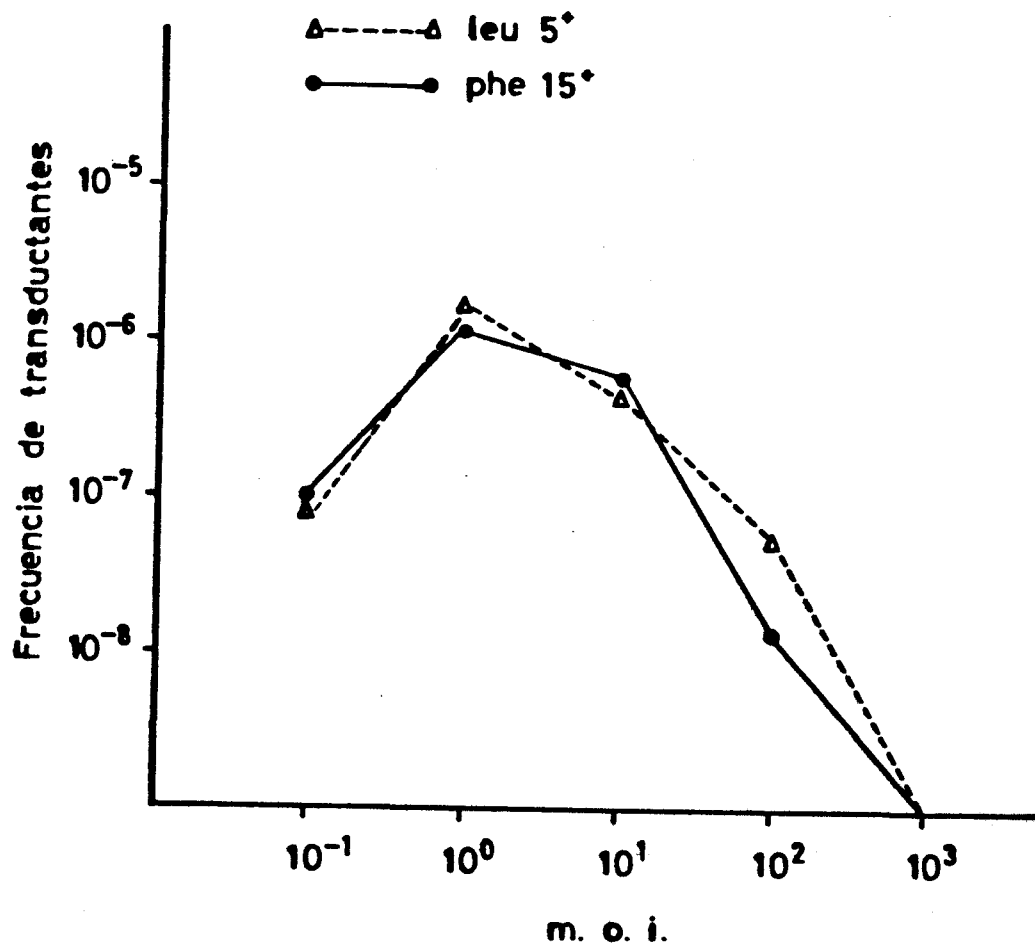
En las condiciones descritas, la aparición de transductantes puede ponerse en evidencia sin necesidad de irradiar los lisados transductores ni de adicionar suero antifago. El contacto de la bacteria y el fago durante 30 minutos resulta suficiente para la adsorción. La centrifugación de las mezclas bacteria/fago elimina suficientemente los fagos no adsorbidos.

Propiedades de los transductantes

El estudio de las propiedades de los transductantes ha indi

Gráfica 1

Efecto de la multiplicidad de infección (m.o.i.) sobre las frecuencias de transducción



Las frecuencias de transductantes se han calculado por unidad formadora de placa (p.f.u.). La multiplicidad de la infección se ha establecido a partir de la titulación del fago ("input m.o.i"). No se han realizado cálculos de adsorción.

Gráfica 2

Inducción con mitomicina C de la raza *R. meliloti* GRC3.
Determinación de las concentraciones óptimas.

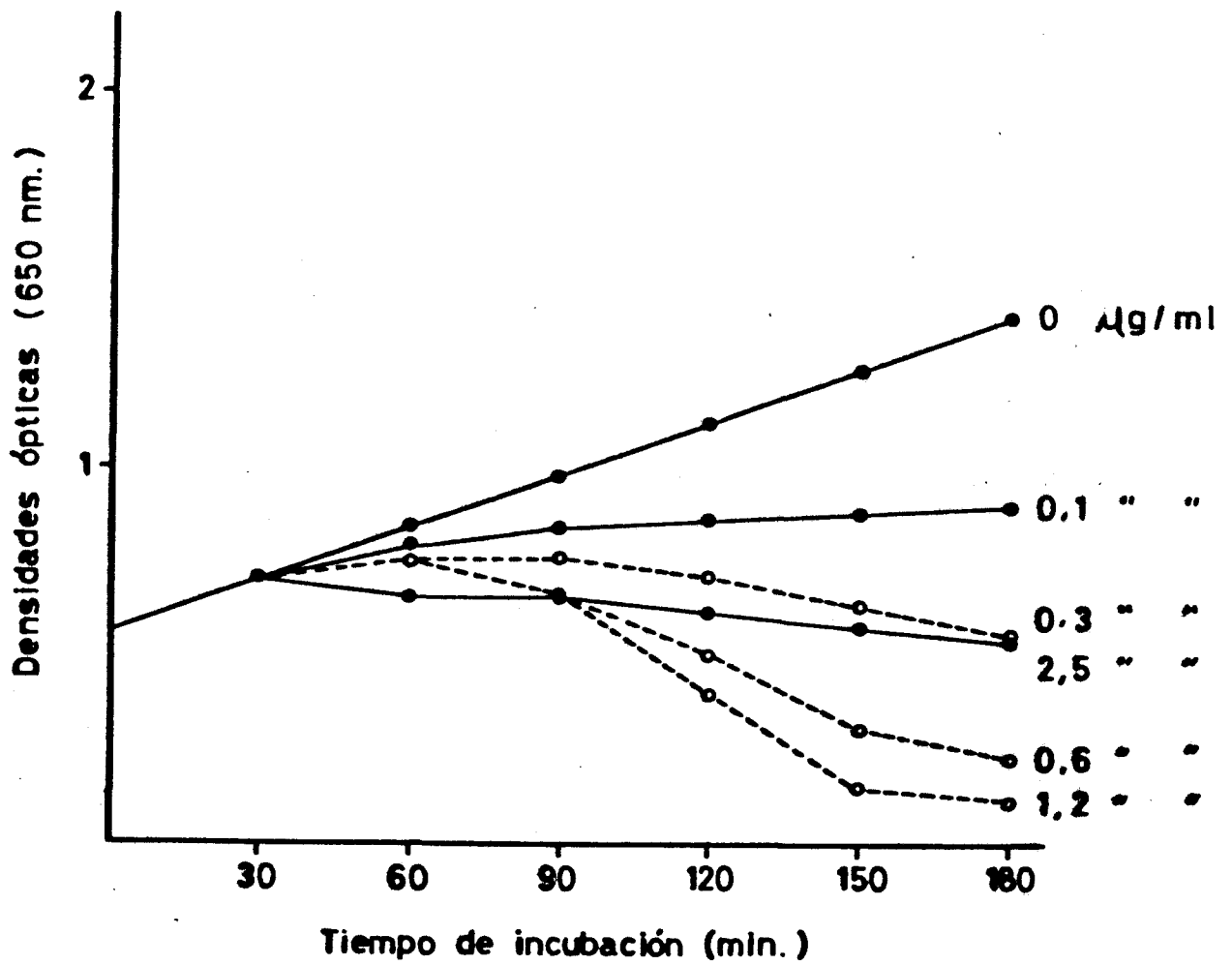


Tabla 12

Propiedades de los transductantes de *R. meliloti* 4c

Marcador transducido	Número de transductantes estudiados	Estabilidad del genotipo (%)	Sensibilidad al fago DF2		Inducción de los transductantes no sensibles
			Sensibles	No sensibles	
<i>leu5</i> ⁺	76	100	74	2	-
<i>phe15</i> ⁺	121	100	119	2	-
<i>str</i>	52	100	52	0	-
<i>arg17</i> ⁺	76	100	70	6	-
<i>ura2</i> ⁺	152	99	151	1	-

lado que en las condiciones descritas, el fago DF2.1 únicamente lleva a cabo una transducción generalizada. (véase Campbell, -- 1964; Ozeki e Ikeda, 1968). Todos los transductantes estudiados han resultado estables para el carácter transducido y en ningún caso se ha detectado segregación significativa. Además, la inmensa mayoría de los transductantes estudiados continuaban siendo sensibles al fago DF2.1. Los escasos clones transductantes - que no resultaron sensibles al fago DF2.1 fueron tratados con mitomicina C para determinar si eran lisogénicos. Se utilizaron las concentraciones que se han juzgado óptimas para *R. meliloti* (véase la gráfica 2). Los resultados fueron negativos, incluso forzando la concentración de mitomicina C. Todos estos datos se resumen en la Tabla 12.

Análisis cotransduccional

Los análisis de cotransducción se han limitado a aquellos - marcadores que, en las experiencias de mapeo por conjugación, - habían mostrado un alto ligamiento. Aunque algunos fagos de *B. subtilis* pueden transducir hasta un 8-10 % de cromosoma (Archer, 1978), lo más corriente es que los exogenotes transferibles por medio de una transducción generalizada no alcancen más de un 2-3 % de la longitud total del cromosoma bacteriano (véase Stent, 1973).

Los análisis se llevaron a cabo replicando en los medios selectivos apropiados los clones transductantes, inicialmente seleccionados para un marcador. Los resultados se detallan en la Tabla 13. Los porcentajes de cotransducción mostraron una varia bilidad mucho menor que los porcentajes de ligamiento obtenidos por conjugación. Ello constituye una garantía de la fiabilidad de los datos.

Algunos resultados han sido particularmente interesantes. Los datos de cotransducción de los genes *str*, *rif* y *orn1* han permitido clarificar el orden y las distancias relativas entre es-

Tabla 13

Cotransducción de varios marcadores de *R. meliloti* 4c por el fago DF2.1

<u>Donador</u>	<u>Receptor</u>	<u>Marcador seleccionado</u>	<u>Marcador cotransducido</u>	<u>% cotransducción</u>
GRC51.2	GRC50	<i>str</i>	<i>rif</i>	37%
			<i>orn1⁺</i>	19
		<i>orn1⁺</i>	<i>str</i>	20
			<i>rif</i>	1
		<i>rif</i>	<i>str</i>	35
GRC51.2	GRC30	<i>ilv3⁺</i>	<i>his29⁺</i>	2
		<i>his29⁺</i>	<i>ilv3⁺</i>	19
GRC54	GRC51.2	<i>phe15⁺</i>	<i>arg17⁺</i>	16
		<i>arg17⁺</i>	<i>phe15⁺</i>	5
				7

El número de transductantes analizados fue de 75 a 150 en diferentes experimentos. En la Tabla no se incluyen los resultados negativos.

tos tres genes, frente a la ambigüedad de los datos obtenidos por conjugación (ligamiento superior al 90%). También es interesante puntualizar que los pares cotransducibles *phe15 - arg17* e *ilv3 - his29* habían sido obtenidos en un solo tratamiento con nitrosoguanidina; el hecho de que se hallen estrechamente ligados concuerda con las propiedades de la NG como mutágeno (Cerdá-Olmedo *et al.* - 1968).

Corrección del mapa de ligamiento y estimación de la longitud real de los exogenotes

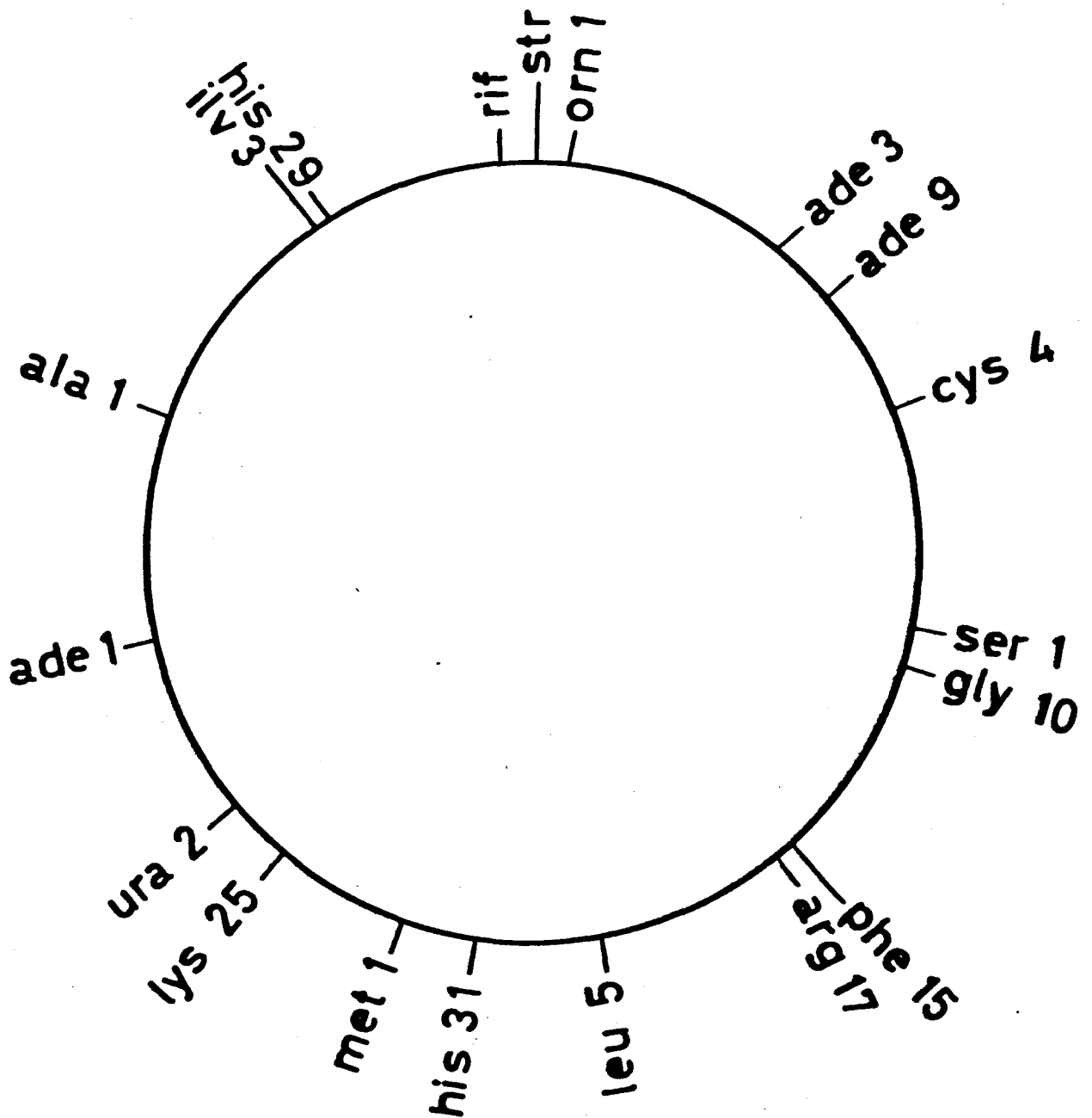
El esbozo de un mapa circular de ligamiento de *R. meliloti*4c queda representado en la Figura 3. Incluye las sugerencias y correcciones proporcionadas por la cotransducción. Se puede observar que dichas correcciones no afectan al orden de los genes reseñado en la gráfica 2.

En las experiencias de conjugación, las máximas longitudes de cromosoma significativamente transferidas fueron *ala1 - str* (4% de ligamiento) y *ade3 - arg17* (2% de ligamiento). Si hay una correlación precisa entre los porcentajes de ligamiento y las distancias físicas, el segmento *ala1 - str* podría representar -- aproximadamente 1/6 de la longitud total del cromosoma y el segmento *ade3 - arg17*, 1/5. Estos resultados coinciden con los de Kondorosi *et al.* (1977).

Por lo que respecta a la longitud de los segmentos transducidos, la máxima longitud cotransducible es *arg15 - phe17* (71% de ligamiento según los datos de conjugación) y la mínima distancia no cotransducible es *ser1 - gly10* (68%). Ello podría indicar el límite físico de la cotransducción, es decir, la máxima cantidad de ADN bacteriano que cabe en la cápsida del fago DF2.1. Aho

Figura 3

Mapa circular de ligamiento de *Rhizobium meliloti* 4c



El esquema procede de la circularización del mapa preliminar re-
señado en la Figura 2 e incluye las correcciones sugeridas por -
la cotransducción. A *grosso modo*, las distancias son inversamen-
te proporcionales a los porcentajes de ligamiento.

ra bien, como se discutirá en las páginas siguientes, los datos de ligamiento proporcionados por la conjugación parecen relativamente imprecisos. Por tanto, no existen suficientes evidencias para afirmar que los porcentajes de ligamiento conjugacional de alrededor de un 70% representen la máxima distancia cotransducible.

El peso molecular del ADN del fago DF2.1 no ha sido determinado aún; por tanto, es imposible hacer estimaciones acerca de la longitud más probable de los segmentos cromosómicos transducibles. Si la Figura 3 refleja las distancias físicas reales, el tamaño máximo de los exogenotes transducibles por el fago DF2.1 podría corresponder a un 3-4% de la longitud total del cromosoma.

Significación de los resultados: consideraciones finales

La utilidad de los Factores R del grupo de incompatibilidad P1 para el análisis genético de *Rhizobium* es indudable. Se trata de plásmidos fácilmente transferibles y algunos de ellos, especialmente el Factor R68.45, promueven transferencia cromosómica a frecuencias suficientemente alejadas de las de reversión.

Sin embargo, se trata de plásmidos que aún no han sido estudiados exhaustivamente y algunas características de su comportamiento no han sido todavía interpretadas. Hasta ahora, el Factor R P1 mejor estudiado ha sido RP4 (Datta *et al.* 1971), del que se ha aislado y analizado un transposón, *Tn1* (Hedges y Jacob, -- 1974; Heffron *et al.* 1977; Hernalsteens *et al.* 1977). Se dispone asimismo de un mapa de RP4, construido a partir de experiencias de inserción de *Tn7* (Barth y Grinter, 1977). También se ha descrito que RP4 actúa como un factor fi^+ sobre el sistema endógeno de fertilidad de *R. lupini* (Pühler y Burkardt, 1978). Sin embargo, las interacciones RP4 / cromosoma no son bien conocidas. Jacob *et*

al. (1976) han descrito que los R-primas derivados del factor RP4 no movilizan cromosoma con mayor eficiencia. Ello parece indicar que el nivel de homología no es el factor limitante en la movilización de cromosoma, a diferencia de lo que ocurre entre los factores F y F' de *E. coli* (véase Low, 1969).

Sobre el Factor R68.45 no se dispone aún de estudios detallados, aunque ya se han obtenido R68.45-primas (Johnston *et al.* 1978). La realidad es que RP4 y R68.45 muestran algunas propiedades comunes, que ya han sido descritas en *Rhizobium* spp. (véase Meade y Signer, 1977; Kondorosi *et al.* 1977; Beringer *et al.* 1978; Johnston *et al.* 1978): ambos factores promueven transferencia cromosómica desde múltiples *loci*; la transferencia no depende de la formación de donadores "Hfr-like", aunque ocasionalmente puedan formarse; la propiedad Cda de las estirpes *Rhizobium* R⁺ es relativamente inestable. Otra característica común a los cruces mediados por RP4 y R68.45 en *Rhizobium* spp. se refiere a las peculiaridades de la recombinación, ya descritas en esta memoria y en otros trabajos (Meade y Signer, 1977; Beringer, *et al.* 1978). La baja frecuencia de entrecruzamientos efectivos puede atribuirse a la bacteria, en el sentido de que *Rhizobium* posea una baja capacidad recombinativa, pero también cabe la posibilidad de que el plásmido conjugativo produzca alguna distorsión en la función *rec* de su nuevo huésped. De hecho, en el sistema conjugacional endógeno de *R. lupini*, no se han descrito problemas de recombinación (Heumann *et al.* 1973).

Los datos de ligamiento obtenidos en los cruces mediados - por estos factores presentan algunas limitaciones dignas de ser consideradas. En primer lugar, la variabilidad de los porcentajes de ligamiento, que puede alcanzar hasta un 100%. Evidentemente, ello debe atribuirse a la variabilidad en el tamaño de los segmentos cromosómicos transferidos, y obliga a aumentar el tama

ño de las muestras estadísticas estudiadas. Por otra parte, las distancias obtenidas en los cruces de tres factores no son aditivas (véase la Tabla 10). Kondorosi *et al.* (1977) han propuesto el uso de la fórmula de Wu para corregir los datos de ligamiento conjugacional. Sin embargo, la ecuación de Wu (1966) está concebida para la corrección de los datos de transducción generalizada, es decir, de un sistema de transferencia en el que la longitud de los exogenotes es relativamente constante. Por tanto, cabe esperar algún método más fiable para la corrección de los datos.

De acuerdo con los resultados expuestos en las páginas anteriores, la cotransducción parece un sistema adecuado para dicha corrección. Los porcentajes de cotransducción obtenidos a partir de diferentes experiencias muestran una variabilidad menor del 20% y en ningún caso se han puesto de manifiesto problemas de recombinación. Por tanto, los datos de cotransducción parecen ofrecer garantías suficientes y autorizan algunas consideraciones sobre la conjugación mediada por R68.45.

Dos pares de marcadores que muestran porcentajes de cotransducción similares, *str - orn1* (19-20%) e *ilv3 - his29* (16-19%) - presentan porcentajes muy diferentes de ligamiento conjugacional (91% y 72%, respectivamente). Por el contrario, pares con un ligamiento conjugacional parecido, *arg17 - phe15* (71%) e *ilv3 - his29* (72%) muestran porcentajes de cotransducción diferentes: 5-7% y 16-19%, respectivamente. Además, resulta sorprendente que - dos marcadores con un 91% de ligamiento conjugacional sólo sean cotransducidos con una frecuencia de un 1-2%.

Todo ello puede interpretarse en el sentido de que algunos valores de ligamiento conjugacional están exagerados. La base de este fenómeno es difícil de interpretar. Todos los marcadores es

tudiados poseen una probabilidad similar de ser transferidos; por tanto, no existe transferencia preferencial de determinadas regiones cromosómicas. Lo que parece existir es una herencia simultánea preferencial. Como hipótesis de trabajo podrían aceptarse dos explicaciones alternativas y atribuir las acentuaciones de herencia simultánea a una cotransferencia preferencial o a una combinación preferencial.

La cotransferencia preferencial podría ser una cuestión de suerte. Un par de marcadores adyacentes a un *locus* de inserción del Factor R tendría mayores posibilidades de ser cotransferido que un par más lejano del punto de inserción, al menos en los cruces no "Hfr-like" y si, como se ha descrito, en los cruces mediados por Factores R P1 los puentes de conjugación son muy frágiles (Jacob *et al.* 1976). Aunque el tamaño de los segmentos cromosómicos arrastrados sea variable, puede existir una longitud más probable y, en este caso, pares de marcadores con ligamiento parecido podrían poseer diferente probabilidad de ser cotransferidos. Los pares cuya distancia del Factor R insertado coincida aproximadamente con la longitud más probable de los segmentos transferibles poseerían un mayor riesgo de que la interrupción de la transferencia se produjera en el tramo que los separa.

La hipótesis alternativa se refiere a una eventual combinación preferente, debida a anomalías del sistema *rec*, causadas o no por el plásmido exógeno. Para admitir una recombinación preferente sería necesario suponer que la probabilidad de "crossing-over" no es idéntica para todos los *loci* cromosómicos. Las anomalías, ya comentadas, de la recombinación autorizan cualquier especulación en este sentido.

Algunas cuestiones relativas al comportamiento del Factor R68.45 dentro de *R. meliloti* están siendo estudiadas en nuestro laboratorio. Pero independientemente de los progresos que puedan

hacerse en el conocimiento de las características de la transferencia cromosómica mediada por Factores R P1, la cotransducción constituye, como en las Enterobacteriáceas, un sistema analítico apropiado para precisar los mapas de ligamiento. Evidentemente, estas técnicas alcanzarán su mayor grado de interés cuando puedan aplicarse al estudio de los genes simbióticos de *Rhizobium*. Entretanto, podrán servir para ampliar y perfeccionar los cortos mapas de ligamiento disponibles.

Además, al igual que ha ocurrido en *Klebsiella*, las experiencias de clonado ("cloning") de los genes *nif* de *Rhizobium* requerirá la selección de un marcador vecino demostrable *in vitro*. La cotransducción puede ser muy útil en este terreno.

ESTUDIOS DE GENETICA DE LAS PROPIEDADES SIMBIOTICAS
DE *Rhizobium meliloti*.

La puesta a punto de técnicas apropiadas para el análisis genético de *Rhizobium*, como las que han sido descritas en las páginas precedentes, constituye un estímulo para la búsqueda de genes simbióticos, (*hsp*, *inf*, *nit*, *eff*, etc.) con vistas a los estudios de localización, expresión, regulación, transferencia y manipulación.

En este tipo de estudios, la dificultad principal reside en la imposibilidad de seleccionar *in vitro* fenotipos simbióticos alterados, por lo que es necesario recurrir a métodos indirectos. En las experiencias que se describen a continuación, se empleó el sistema de análisis *in vitro-in vivo*, estudiando *a posteriori* el comportamiento simbiótico de una serie de razas previamente caracterizadas. El uso de nitrosoguanidina para la obtención de mutantes permite esperar que, en algún caso, el área de mutación pudiera alcanzar a un gen simbiótico vecino de un marcador seleccionable *in vitro*; el análisis genético apropiado permitiría descubrir su existencia.

La colección de razas utilizadas, que incluye diferentes clases de fenotipos, se detalla en la Tabla 14. Todas estas razas han sido estudiadas en relación a los fenotipos *Inf* y *Eff*.

Como puede observarse en la Tabla 15, todas las razas estudiadas resultaron *Inf*⁺. Ninguna de las mutaciones estudiadas acarrea la pérdida de la infectividad. En el caso de la auxotrofia, estos resultados apoyan los obtenidos por Scherrer y Dénarié (1971) y por Malek (1974), autores que no trabajaron con auxotrofos múltiples de *R. meliloti*.

En contraste, varias razas auxotróficas se han comportado co-

Tabla 14

Razas de *R. meliloti* utilizadas en los estudios de infectividad y efectividad.

<u>Raza</u>	<u>Características</u>
203	silvestre
GRC1	203 Str ^r
GRC4	203 Pur ⁻
GRC10	203 Gua ⁻
GRC11	203 AL1 ^r
GRC12	203 Ala ⁻ Ser ⁻
GRC12.1	203 Ala ⁻ Ser ⁻ Str ^r
GRC15	203 Ala ⁻
GRC21	203 Ade ⁻ (<i>ade3</i>)
GRC21.0	203 Ade ⁺ , revertiente (<i>ade3</i> ⁺)
GRC28	203 Ade ⁻ (<i>ade2</i>)
GRC70	203 Ilv ⁻ His ⁻
2	silvestre
GRC3	lisogénica (2(AL1))
402	silvestre
4c	402. Producción disminuída de polisacárido. Baja inducción de poligalacturonasa. AL1 ^r . (PG ⁻).
GRC50	4c Orn ⁻ (<i>orn1</i>)
GRC51	4c Phe ⁻ Arg ⁻ (<i>phe15 arg17</i>)
GRC51.1	4c Phe ⁻ Arg ⁻ Str ^r (<i>phe15 arg17 str</i>)
GRC51.2	4c Phe ⁻ Arg ⁻ Str ^r Rif ^r (<i>phe15 arg17 str rif</i>)
GRC52	4c Leu ⁻ (<i>leu5</i>)
GRC54	4c Cys ⁻ (<i>cys4</i>)
GRC55	4c Leu ⁻ His ⁻ Lys ⁻ (<i>leu5 his31 lys25</i>)

Tabla 14 (continuación)

Raza	Características
GRC56	4c Ade ⁻ Ura ⁻ Cys ⁻ (<i>ade9 ura2 cys4</i>)
GRC57	4c Thi ⁻ Fol ⁻
GRC58	4c, lento crecimiento
GRC58.1	58 Str ^r
GRC59	4c Arg ⁻ Ade ⁻ (<i>arg17 ade3</i>)
GRC60	4c Rou
GRC61	4c Thr ⁻
GRC100	4c Sar ⁻

Cuando no se indica expresamente, se ha utilizado la nomenclatura propuesta por Demerec *et al.* (1966). El símbolo Fol⁻ designa el requerimiento de ácido fólico. El símbolo Sar⁻ se aplica a la incapacidad de utilizar el sulfato. El fenotipo "crecimiento lento" designa las razas que no muestran crecimiento significativo a las 48 horas de incubación en medio YGT líquido.

Cuando se conoce el genotipo de las razas, se indica entre paréntesis a continuación del fenotipo.

Tabla 15

Propiedades de las razas estudiadas de *R. meliloti*
 en simbiosis con su huésped, *Medicago sativa* L.

<u>Raza</u>	<u>Fenotipo simbiótico</u>	
	<u>Inf</u>	<u>Eff</u>
203	+	+
GRC1	+	+
GRC4	+	-
GRC10	+	+
GRC11	+	+
GRC12	+	+
GRC12.1	+	+
GRC15	+	+
GRC21	+	-
GRC21.0	+	+
GRC28	+	-
GRC70	+	+
2	+	+
GRC3	+	+
402	+	+
4c	+	+
GRC50	+	+
GRC51	+	+
GRC51.1	+	+
GRC51.2	+	+
GRC52	+	-
GRC54.0	+	+
GRC55	+	-
GRC56	+	-
GRC57	+	+
GRC58	+	+
GRC58.1	+	+
GRC59	+	-
GRC60	+	-
GRC61	+	+
GRC100	+	+

mo Eff^- . Sólo han sido consideradas como tales aquellas razas cuya capacidad de reducción de acetileno era de un 0-5% en rela---ción a la de la raza silvestre. Como ya se ha comentado anterior---mente, parece aconsejable no tomar en cuenta las diferencias graduales, que permitirían clasificar algunas razas como Eff inter---medias. Las medidas de actividad específica de nitrogenasa varían entre las propias razas silvestres y entre las diferentes medidas de una misma raza, presuntamente a causa de factores incontrola---bles del estado fisiológico de los nódulos.

El comportamiento Eff^- de las razas GRC4, GRC21, GRC28, GRC52, GRC55 y GRC56 (véase la Tabla 15) corrobora los resultados obte---nidos por Dénarié *et al.* (1976), en el sentido de que las muta---ciones Ade^- , Leu^- y Pur^- acarrear la pérdida de la efectividad. Los revertientes prototróficos son siempre efectivos y la adi---ción del nutriente en cuestión restaura el fenotipo silvestre -- Eff^+ . Además, todos los genotipos *ade* han mostrado similar com---portamiento Eff^- . No existe, por tanto, ninguna mutación *eff* ad---yacente a esos genes. La pérdida de la efectividad debe atribuir---se a un efecto pleotrópico, ejercido sin duda a través del blo---queo de determinadas rutas metabólicas.

Estudio cuantitativo de la infectividad

La infectividad no ha podido ser abordada desde una óptica cuantitativa hasta la introducción, en nuestro laboratorio, de técni---cas de control de la población bacteriana en la rizosfera. Las de---terminaciones del grado de infectividad, obtenidas por medio del uso de tetraciclina, reproducen los resultados que se obtienen en las experiencias de competición entre razas y constituyen, por -- tanto, mediciones significativas de la velocidad de infección(Oli---vares *et al.* sometido a publicación).

Hay que tener en cuenta que, en el suelo, la velocidad diferencial de infección debe constituir un factor de selección de primer orden. En los cultivos hidropónicos utilizados para el estudio de la infectividad *in vitro*, la utilización de inóculos masivos y la ausencia de factores ecológicos negativos impiden apreciar diferencias significativas entre razas. La técnica de adición de tetraciclina permite apreciar claramente esas diferencias.

En la Tabla 16 se relaciona el número de nódulos producidos por las razas estudiadas, aplicando la técnica citada. En la Tabla 17 se detallan los coeficientes de infectividad a diferentes tiempos de adición de antibiótico. En la Tabla 18 se relaciona el grado de infectividad de las razas estudiadas, referido en todos los casos al de las razas silvestres.

Puede observarse que determinados caracteres no acarrear modificación alguna del grado de infectividad. Tales son la lisogenia para el fago AL1, la resistencia al mismo fago y la resistencia a antibióticos (estreptomycin, rifampicina).

En el caso de la raza lisogénica GRC3, es importante matizar que se trata de una raza relativamente inestable en la solución de Rigaud y Puppo, con una frecuencia de inducción espontánea de alrededor de 10^{-1} en las primeras 24 horas (véase la gráfica 5). Sin embargo, ello no incide en el grado de infectividad; se debe interpretar, por consiguiente, que el número de células que no se inducen resulta suficiente para que la probabilidad de copar los puntos susceptibles a la infección siga siendo idéntica a la de la raza parental, no lisogénica. De hecho, un inóculo de 980 células/ml es capaz de producir el mismo número de nódulos que uno de 10^6 cel/ml (Olivares *et al.*, sometido a publicación).

La resistencia al fago AL1 tampoco produce ninguna alteración del grado de infectividad de *R. meliloti*. Ello indica que la mu

Tabla 16

Producción de nódulos por las razas estudiadas de *R. meliloti* bajo las condiciones descritas por Olivares *et al.*

Raza	Número de nódulos			
	sin Tc	con Tc		
		48h	72h	96h
203	30.4 \pm 3.1	16.6 \pm 1.5		
GRC1	30.4 \pm 3.8	14.8 \pm 2.8		
GRC4	27.6 \pm 3.5	3.3 \pm 1.0		
GRC10	28.0 \pm 0.5	2.6 \pm 1.0		
GRC11	31.8 \pm 2.9	13.8 \pm 2.6		
GRC12	23.0 \pm 3.4	4.6 \pm 3.0		
GRC12.1	28.0 \pm 2.1	8.0 \pm 1.4		
GRC15	33.0 \pm 3.2	5.1 \pm 2.5		
GRC21	26.0 \pm 3.5	3.5 \pm 0.5		
GRC21.0	29.5 \pm 4.2	15.5 \pm 2.0		
GRC28	28.0 \pm 2.4	2.7 \pm 1.6		
GRC70	29.6 \pm 4.0	1.7 \pm 1.2		
2	29.6 \pm 2.5	16.8 \pm 1.6		
GRC3	30.1 \pm 1.2	15.2 \pm 2.0		
402	30.4 \pm 3.1	14.4 \pm 2.2		
4c	28.5 \pm 3.9	9.8 \pm 3.1		
GRC50	19.6 \pm 2.2	1.5 \pm 0.5	4.5 \pm 0.5	10.2 \pm 0.8
GRC51	25.8 \pm 1.9	0	0	1.8 \pm 0.8

Tabla 16 (continuación)

Raza	Número de nódulos			
	sin Tc	con Tc		
		48h	72h	96h
GRC51.1	28.8 \pm 1.7			2.0 \pm 0.7
GRC51.2	21.0 \pm 2.5	0		1.7 \pm 0.9
GRC52	24.3 \pm 0.3	0	1.2 \pm 0.3	5.7 \pm 1.2
GRC54.0	14.3 \pm 2.3	1.5 \pm 1.0		
GRC55	28.5 \pm 2.8	0	0.5 \pm 0.3	4.2 \pm 0.9
GRC56	24.0 \pm 2.9			1.5 \pm 0.5
GRC57	29.0 \pm 3.3			8.0 \pm 0.8
GRC58	29.7 \pm 1.7	0.6 \pm 0.8		7.7 \pm 2.0
GRC58.1	29.6 \pm 3.2			7.0 \pm 1.4
GRC59	26.6 \pm 2.0			1.8 \pm 0.8
GRC60	29.8 \pm 3.0	0	0	2.0 \pm 1.0
GRC61	23.7 \pm 3.0		2.0 \pm 1.1	5.2 \pm 0.9
GRC100	37.3 \pm 2.0	3.5 \pm 1.1		

Se han contabilizado el número de nódulos por tubo (5 plantas). Los resultados son la media aritmética de 3 experimentos, en cada uno de los cuales se usaron 10 tubos por serie.

Tabla 17

Coefficientes de infectividad (C_i) de las razas estudiadas de *R. meliloti*.

Raza	C_i		
	48h	72h	96h
203	54.0		
GRC1	48.6		
GRC4	11.9		
GRC10	2.3		
GRC11	43.4		
GRC12	19.8		
GRC12.1	28		
GRC13	15.0		
GRC21	13.0		
GRC21.0	52.0		
GRC28	9.6		
GRC70	5.7		
2	56.0		
GRC3	52.2		
402	47.0		
4c	34.0		
GRC50	7.6	22.9	52.0
GRC51			6.9
GRC51.1			6.9
GRC51.2			8.3
GRC52		4.9	23.0
GRC54.0	10.0		
GRC55			14.7
GRC56			6.2
GRC57			27.0
GRC58			25.9
GRC59.1			28.7
GRC59			6.7
GRC60			6.7
GRC61		8.4	22.0
GRC100	8.4		

Tabla 18

Grado de infectividad (G_i) de las razas estudiadas de *R. meliloti*

Raza	G_i		
	1	2	3
203	100		100
GRC1	100		100
GRC4	24.4		24.4
GRC10	19.0		19.0
GRC11	100		100
GRC12	40.7		40.7
GRC12.1	57.4		57.4
GRC15	30.0		30.0
GRC21	26.6		26.6
GRC21.0	100		100
GRC28	19.7		19.7
GRC70	11.7		11.7
2	100		100
GRC3	100		100
402	100		100
4c	69.0		69.0
GRC50	15.0	100	15.0
GRC51	-	13.2	1.9
GRC51.1	-	13.2	1.9
GRC51.2	-	15.9	2.4
GRC52	-	44.0	6.6
GRC54.0	20.0		20.0
GRC55	-	28.2	4.2
GRC56	-	11.9	1.7
GRC57	-	51.9	7.8
GRC58	-	49.0	7.3

Tabla 18 (continuación)

Raza	G_i		
	1	2	3
GRC59	-	12.8	1.9
GRC60	-	12.8	1.9
GRC61	-	42.0	17.2
GRC100	17.2		

Los valores de la columna 1 han sido obtenidos tomando como $G_i = 100$ la media aritmética de los coeficientes de infectividad de las razas silvestres 103, 402, y 2.

Para comparar el grado de infectividad de las razas menos infectivas, que no dan resultados significativos cuando se adiciona tetraciclina a las 48 horas, se tomó como $G_i = 100$ el coeficiente de infectividad de la raza GRC50 con adición de tetraciclina a las 96 h. Estos valores se relacionan en la columna 2.

Para obtener datos comparativos de todas las razas, se han extrapolado a 48 horas los resultados de las razas poco infectivas. La columna 3 incluye dichos valores.

tación de resistencia no altera los efectores Inf de la superficie bacteriana. Por tanto, no parece tratarse de receptores comunes, como pudiera deducirse de algunos trabajos anteriores (Kleczkowska, 1965).

Tampoco han aparecido modificaciones del grado de infectividad como consecuencia de las mutaciones Str^r y Rif^r , ni siquiera cuando ambas coexistían en una misma raza. Ello puede suponer una aportación a la polémica sobre la elección de los marcadores más apropiados para los estudios de tipo ecológico (véase Schwingamer y Dudman, 1973; Amarger, 1975). Las mutaciones de resistencia a la estreptomycinina y a la rifampicina, puesto que no afectan en absoluto a los caracteres Inf^+ y Eff^+ , parecen adecuadas para el seguimiento de *R. meliloti* en el suelo.

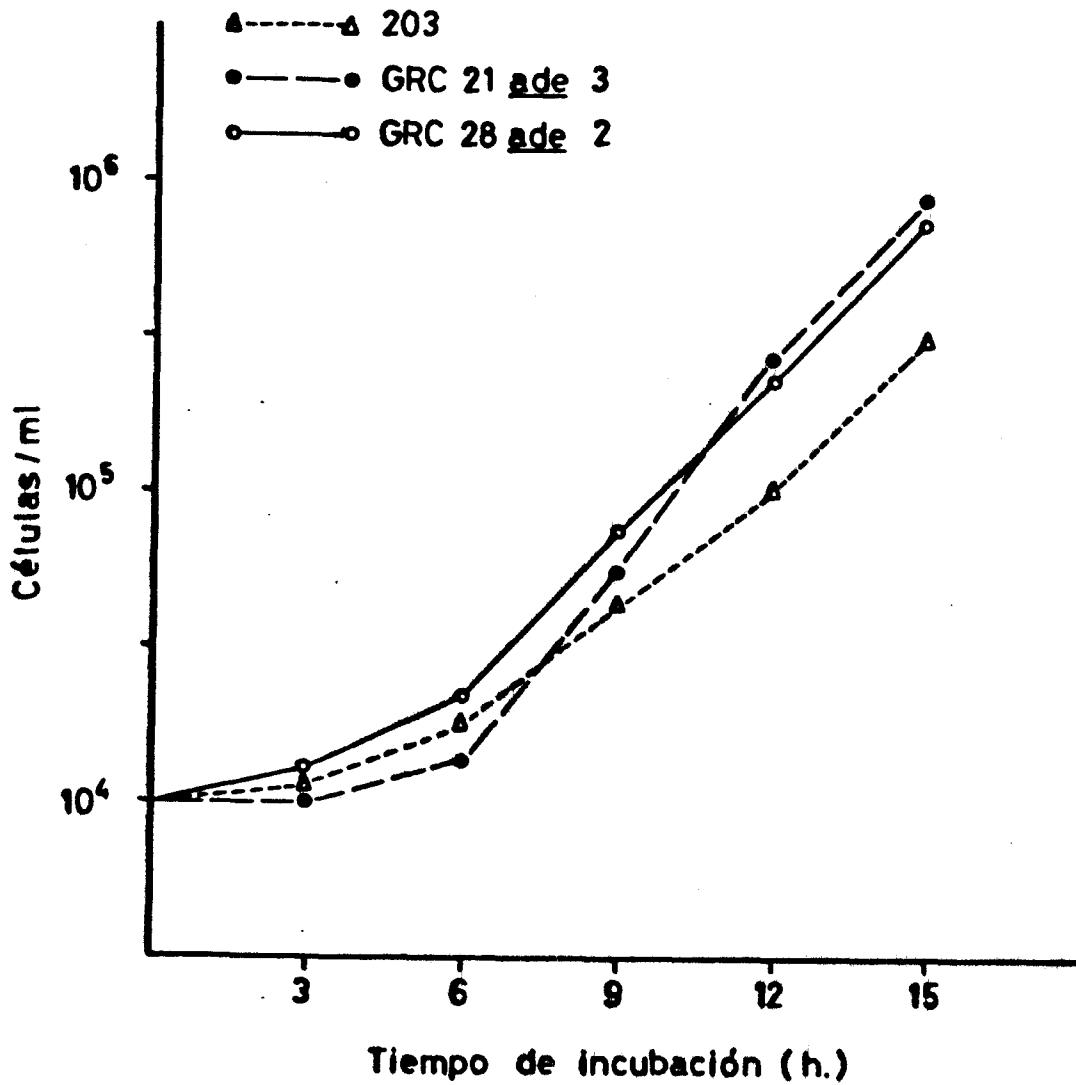
Mutaciones que alteran el grado de infectividad

Como puede observarse en la Tabla 18, la auxotrofia y la modificación de la morfología de la colonia alteran significativamente el grado de infectividad.

Todas las razas auxotróficas estudiadas muestran un grado de infectividad menor que el de la raza silvestre de la que proceden. Aunque, de acuerdo con la hipótesis de Zamenhof y Eichhorn (1967), algunas razas auxotróficas pueden aventajar a las silvestres cuando crecen en un medio enriquecido, (véase la Gráfica 3), la situación se invierte en los medios normales de cultivo (Gráfica 4). Es presumible que en la rizosfera, indudablemente más pobre que el medio YGT, la presión de selección a favor de las razas silvestres sea aún más intensa. Por tanto, a nivel de la proliferación rizosférica, la auxotrofia debe constituir una desventaja selectiva.

Gráfica 3

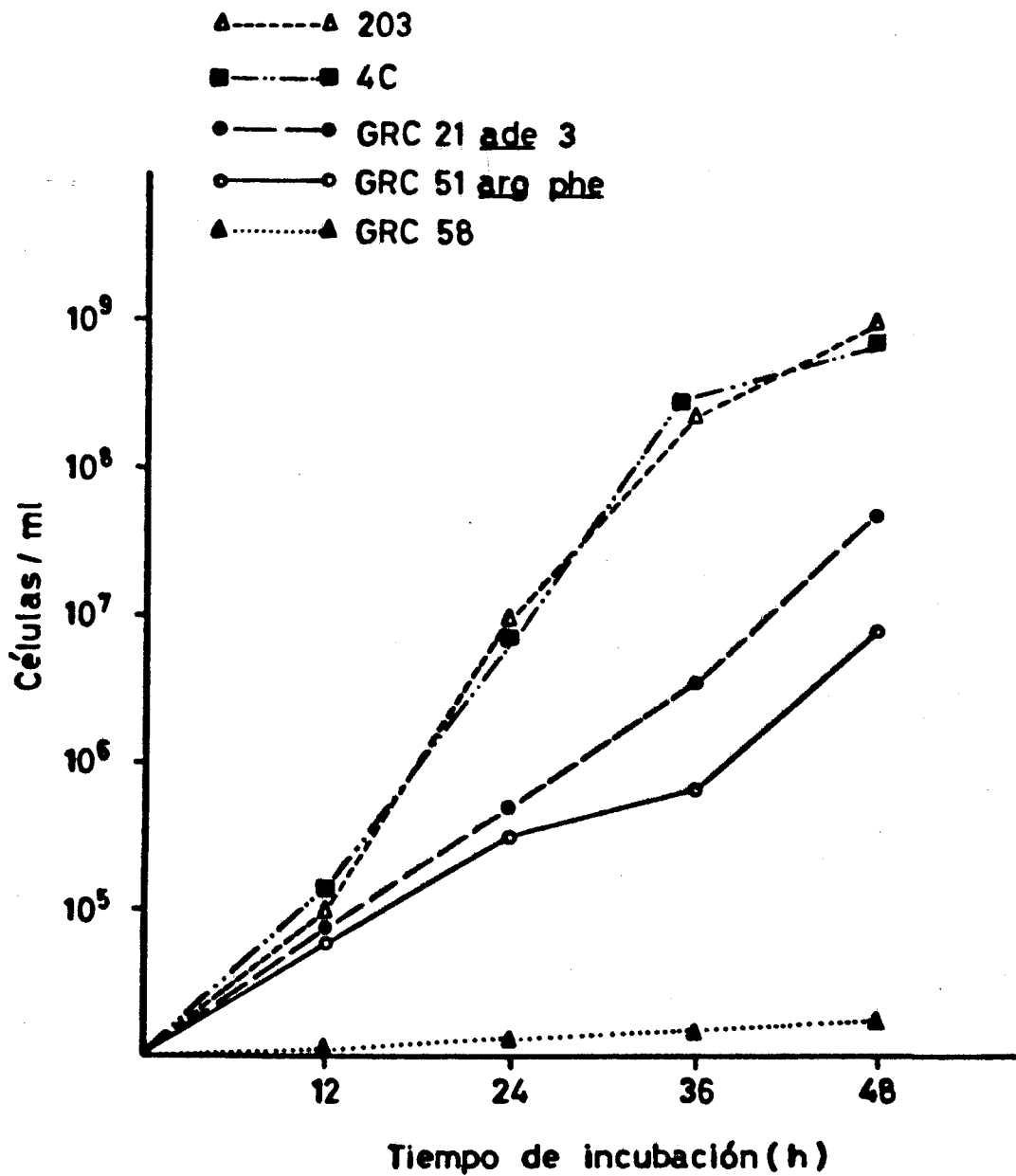
Curvas de crecimiento de la raza silvestre Rm203 y de dos derivadas Ade⁻ en un medio enriquecido



Los cultivos se llevaron a cabo en medio YGT adicionado de adenina (Sigma) 0.5 mM. Los recuentos del número de células viables se realizaron en medio 79 de Allen adicionado de -- cristal violeta.

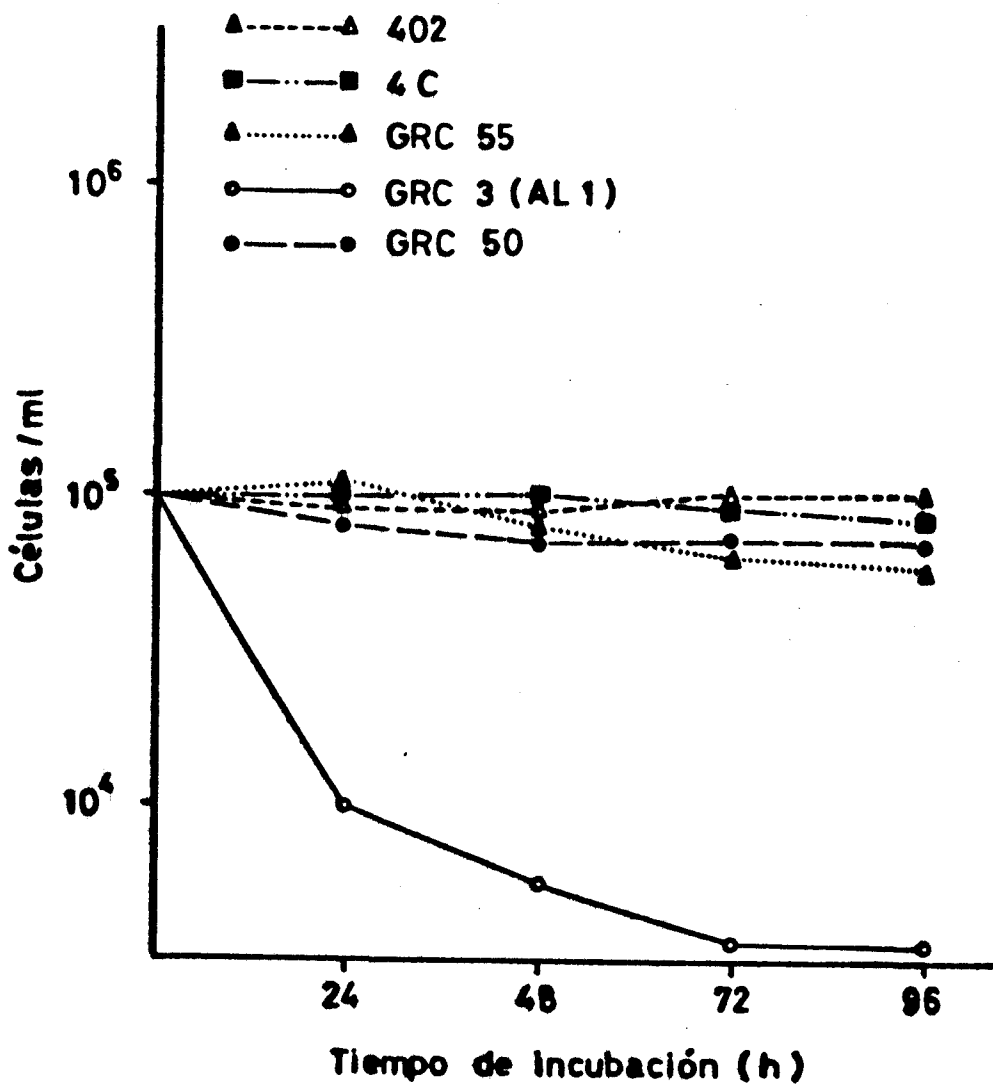
Gráfica 4

Curvas de crecimiento de diferentes razas de *R. meliloti* en medio YGT



Gráfica 5

Curvas de viabilidad de diferentes razas de *R. meliloti* en la solución nutritiva de Rigaud y Puppo.



Sin embargo, las diferencias en el grado de infectividad que han aparecido en las experiencias que se describen no son atribuibles a la tasa diferencial de multiplicación, puesto que ninguna de las razas estudiadas, ni siquiera las silvestres, prolifera significativamente en la solución de Rigaud y Puppo (Gráfica 5; J. Rigaud, comunicación personal). Por otra parte, la adición del nutriente o nutrientes requeridos no mejora los coeficientes de infección. Ello indica que la repercusión de la auxotrofia sobre la capacidad infectiva tiene lugar en una fase más tardía y que el grado diferencial de infectividad depende de la velocidad con que cada raza puede ponerse fuera del alcance del antibiótico. Cabe suponer que ello ocurre a nivel del cordón de infección.

Diferentes mutaciones de auxotrofia poseen efectos parecidos sobre el grado de infectividad. Incluso poseen carácter aditivo: una raza con dos marcadores nutritivos siempre es menos infectiva que un mutante simple, independientemente de cuáles sean dichos marcadores (Tabla 18). Se trata, por tanto, de efectos absolutamente inespecíficos. Hay que admitir que el crecimiento a lo largo del cordón de infección debe resultar más lento y más difícil cuanto mayor sea el grado de dependencia nutricional.

La interpretación del comportamiento de la raza rugosa GRC60 resulta más problemática. La adición de polisacárido extracelular de la raza silvestre no restaura el grado de infectividad. Puede tratarse de una mutación a nivel de lipopolisacárido, hipótesis que está siendo examinada en nuestro laboratorio.

Importancia del plásmido PG en relación con la infectividad

El plásmido PG, que parece codificar la composición y el grado de producción de los polisacáridos extracelulares y subsiguiente-

Tabla 19

Efecto de la adición de polisacáridos extracelulares de la raza silvestre 402 sobre el grado de infectividad de *R. meliloti* 4c.

	Número de nódulos			
	Sin polisacárido		Con polisacárido	
	Sin Tc	Con Tc	Sin Tc	Con Tc
402	31.2 ± 3.5	14.4 ± 2.2	28.9 ± 3.5	15.1 ± 2.5
4c	30.1 ± 2.2	8.7 ± 2.4	28.4 ± 2.5	14.8 ± 1.8

	C _i		G _i	
	Sin polisac.	Con polisac.	Sin polisac.	Con polisac.
402	49.0	50.2	100	100
4c	32.3	48.9	66	98

Todos los datos se hallan referidos a la adición de tetraciclina a las 48 horas.

mente la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa (Palomares, 1975; Olivares *et al.* 1977) posee una influencia --- cuantitativa sobre el grado de infectividad de *R. meliloti*: las razas curadas resultan un 30-40% menos infectivas que la raza parental PG⁺ (Tabla 18).

Este dato se halla refrendado por el comportamiento de los mutantes auxotróficos. Como puede observarse en la misma Tabla, la depresión del grado de infectividad debida a la auxotrofia es -- proporcionalmente más grave en las razas PG⁻.

Pero, además, la adición de polisacárido extracelular de la raza silvestre 402 restaura hasta el 98% el grado de infectividad de la raza curada 4c (Tabla 19). Ello corrobora la hipótesis de que el plásmido PG, a través de la producción de los polisacáridos extracelulares, ejerce algún control sobre el proceso de infección.

CONCLUSIONES

1. Aunque el factor R68.45 es un plásmido conjugativo útil para el análisis genético de *R. meliloti*, los datos de ligamiento obtenidos a partir de las experiencias de transferencia cromosómica promovida por dicho plásmido deben ser corregidos mediante un sistema apropiado.
2. La transducción generalizada por el fago DF2.1 y el subsiguiente análisis cotransduccional constituyen un método adecuado para -- precisar los mapas cromosómicos de ligamiento de *R. meliloti*.
3. Los caracteres simbióticos Inf y Eff de *R. meliloti* son sensibles a numerosos efectos pleotrópicos, debidos a mutaciones de genes - no simbióticos.
4. Las estirpes silvestres de *R. meliloti* poseen un mayor grado de infectividad que las curadas. Ello puede derivarse de la presencia - del plásmido PG, posiblemente a través de la producción de los polisacáridos extracelulares.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M.H. 1966. Bacteriophages. *John Wiley & Sons Co.*
- ADELBERG, E.A., PITTARD, J. 1965. Chromosome transfer in bacterial conjugation. *Bacteriol. Rev.* 29. 161.
- AKKERMANS, A.D.L., ABDULKADIR, S., TRINICK, M.J. 1978. Nitrogen-fixing root nodules in Ulmaceae. *Nature* 274. 190.
- AL-ANI, F.Y. 1973. Genetic investigations on the root nodule bacteria Rhizobium. *PhD Thesis. University of Liverpool.*
- ALDEN, M., ROGERS, S. 1977. Segregation of genes for nitrogen fixation into minicells of Escherichia coli. *Proc. Soc. exp. Biol. Medic.* 155. 357.
- ALLEN, O.N. 1951. Experiments in soil bacteriology. *Burgess Publish. Minneapolis.*
- AMARGER, N. 1975. Efficience symbiotique de mutants spontanés de Rhizobium leguminosarum résistants à la streptomycine, spectinomycine ou kanamycine. *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.* 28. 1911.
- ARCHER, L.J. 1978. Transferências genéticas em bacilos: mecanismos e aplicações. *Símpoio de Genética Bacteriana. XVI Jornadas de Genética Luso-Espanólas. Córdoba. p. 62. Resúmen.*
- AUSUBEL, F.M., MARGOLSKEE, R.F., MAIZELS, N. 1977a. Mutants of Klebsiella pneumoniae in which expression of Nitrogenase is independent of Glutamine-synthetase control. En "Recent developments in Nitrogen Fixation". ed. Newton. Postgate. *Rodríguez Barrueco. Academic Press. p. 357.*
- AUSUBEL, F., RIEDEL, G., CANNON, F., PESKIN, A., MARGOLSKEE, R.F. 1977b. Cloning Nitrogen Fixation genes from Klebsiella

- pneumoniae in vitro and the isolation of nif-promoter mutants affecting Glutamine-synthetase regulation. En "*Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*". ed. Hollaender *et al.* Plenum Press. p. 111.
- BADHURI, S.N. 1951. Influence of the numbers of Rhizobium supplied on the subsequent nodulation of the legume host plant. *Ann. Bot.* 15. 209.
- BALASSA, G. 1963. Genetic transformation of Rhizobium: A review of the work of a R. Balassa. *Bacteriol. Rev.* 27. 228.
- BALASSA, R. 1954. Transformation mechanismen der Rhizobium. I-III. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 2. 51.
- BALASSA, R. 1955. In vivo induzierte transformation bei Rhizobien. *Naturwissenschaften.* 43. 422.
- BALASSA, R. 1957. Durch desoxybonukleinsäuren induzierte Veränderungen bei Rhizobien. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 4. 77.
- BALASSA, R. 1960. Transformation of a strain of Rhizobium lupini. *Nature.* 188. 246.
- BALASSA, R., GABOR, M. 1961. Transformation in nodule bacteria. *Mikrobiologya.* 30. 457.
- BARNET, Y.M., VINCENT, J.M. 1970. Lysogenic conversion of Rhizobium trifolii. *J. gen. Microbiol.* 61. 319.
- BARON, L.S., GEMSKI, P., JOHNSON, E.M., WOHLHIETER, J.A. 1968. Intergeneric bacterial matings. *Bact. Rev.* 32. 362.
- BARTH, P.T., GRINTER, N.J. 1977. Tn7 insertion map of RP4. En "*DNA insertion elements, plasmids and episomes*". ed. Bukhari. Shapiro. *Adhya. Cold Spring Harbor.* p. 675.
- BECHET, M., GUILLAUME, J.B. 1978. Mise en évidence d'ADN extrachromosomique chez Rhizobium meliloti. *Can. J. Microbiol.* 24. 960.

- BECKING, J.H. 1971. The physiological significance of the leaf nodules of *Psychotria*. *Plant and Soil. Special Vol.* 361.
- BEDMAR, E.J. 1978. Estudios sobre fijación en vida libre y transferencia genética en *Rhizobium*. *Tesis Doctoral. Univ. Granada.*
- BERGERSEN, F.J., TURNER, G.L. 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochim. Biophys. Acta.* 141. 507.
- BERINGER, J.E. 1974a. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. gen. Microbiol.* 84. 188.
- BERINGER, J.E. 1974b. Chromosomal recombination and mapping in *Rhizobium leguminosarum*. *Nature.* 264. 291.
- BERINGER, J.E., JOHNSTON, A.W.B., WELLS, B. 1977. The isolation of conditional ineffective mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. gen. Microbiol.* 98. 339.
- BERINGER, J.E., HOGGAN, S.A., JOHNSTON, A.W.B. 1978. Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R plasmid-mediated recombination. *J. gen. Microbiol.* 104. 201.
- BISHOP, P.E., DAZZO, F.B., APPLEBAUM, E.R., MAIER, R.J., BRILL, W.J. 1977. Intergeneric transfer of genes involved in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Science* 198. 938.
- BONNIER, C., BRAKEL, J. 1969. Lutte biologique contre la faim. *Duculot. Gembloux.*
- BOSE, P.D., VENKATARAMAN, G.S. 1969. Recombination in *R. leguminosarum*. *Experientia* 25. 772.
- BOUCHER, C., BERGERON, B., BARATE DE BERTALMIO, M., DENARIE, J. 1977. Introduction of bacteriophage Mu into *Pseudomonas solanacearum* and *Rhizobium meliloti* using the R factor RP4. *J. gen. Microbiol.* 98. 253.

- BROWN, C.M., DILWORTH, M.J. 1975. Ammonia assimilation by Rhizobium culture and bacteroids. *Can. J. Microbiol.* 19. 1493.
- CAMPBELL, A. 1964. Transduction. En "*The Bacteria*". ed. Gunsalus. Stanier. Academic Press. Vol. 5. p. 49.
- CAMPBELL, A., BERG, D., LEDERBERG, E., STARLINGER, P., BOTSTEIN, D., NOVICK, R., SZYBALSKI, W. 1977. Nomenclature of transposable elements in Prokaryotes. En "*DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes*". ed. Bukhari. Shapiro. Adhya. Cold Spring Harbor. p. 15.
- CANNON, F.C., DUNICAN, L.K., O'GARA, F. 1971. Dye-buoyant-density gradient analysis of Rhizobium deoxybonucleic acid. *Biochem. J.* 125. 103.
- CANNON, F.C. 1972. A study of effectiveness and viomycin resistance in relation to genome structure of Rhizobium. Ph.D. Thesis. University College. Galway.
- CANNON, F.C., DIXON, R.A., POSTGATE, J.R., PRIMROSE, S.B. 1974a. Chromosomal integration of Klebsiella nitrogen fixation genes in Escherichia coli. *J. gen. Microbiol.* 80. 227.
- CANNON, F.C., DIXON, R.A., POSTGATE, J.R., PRIMROSE, S.B. 1974b. Plasmids formed in nitrogen-fixing Escherichia coli-Klebsiella pneumoniae hybrids. *J. gen. Microbiol.* 80. 241.
- CANNON, F.C., POSTGATE, J.R. 1976. Expression of Klebsiella nitrogen fixation (nif) genes in Azotobacter. *Nature* 260. 271.
- CANNON, F.C., DIXON, R.A., POSTGATE, J.R. 1976. Derivation and properties of F-prime factors in Escherichia coli carrying nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae. *J. gen. Microbiol.* 93. 111.
- CARLBERG, D.N. 1976. Essentials of bacterial and viral genetics. C. Thomas. Publ.

- CARO, L., BERG, C.M. 1971. P1 Transduction. *Methods in Enzymology*. 21D. 444.
- CERDA-OLMEDO, E., HANAWALT, P.C., GUEROLA, N. 1968. Mutagenesis of the replication point by Nitrosoguanidine: Map and pattern of replication of the Escherichia coli chromosome. *J. mol. Biol.* 33. 705.
- CLOWES, R.C. 1961. Colicin factors as fertility factors in bacteria: E. coli K1. *Nature* 190. 988.
- COLE, M.A., ELKAN, G.H. 1973. Transmissible resistance to Penicillin G, Neomycin and Chloramphenicol in Rhizobium japonicum. *Antimicrob. Chemother. Agents* 4. 248.
- CONSTABEL, F., DUDITS, D., GAMBORG, O.L., KAO, K.N. 1975. Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons. *Can. J. Bot.* 53. 2092.
- CORRAL, E., MONTOYA, E., OLIVARES, J. 1978. Sensitivity to phages in R. meliloti as a plasmid consequence. *Microbios letters*. 5. 77.
- CURTISS, R., RENSHAW, J. 1969. F⁺ strains of E. coli K12 defective in Hfr formation. *Genetics* 63. 7.
- CUTTING, J.A., SCHULMAN, H.M. 1969. The site of heme synthesis in soybean root nodules. *Biochim. Biophys. Acta* 192. 486.
- CUTTING, J.A., SCHULMAN, H.M. 1971. Biogenesis of leghaemoglobin. The determinant in the Rhizobium-legume symbiosis for leghaemoglobin specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 229. 58.
- CHILD, J.J. 1975. Nitrogen fixation by a Rhizobium sp. in association with non-leguminous plant cell cultures. *Nature* 253. 350.
- CHILTON, M., FARRAND, S.K., LEVIN, R., NESTER, E.W. 1976. RP4 promotion of transfer of a large Agrobacterium plasmid which confers virulence. *Genetics* 83. 609.

- DATTA, N., HEDGES, R.W., SHAW, E.J., SYKES, R.B., RICHMOND, M.H. 1971. Properties of an R. factor from Pseudomonas aeruginosa. *J. Bacteriol.* 108. 1244.
- DATTA, N., HEDGES, R.W. 1972. Host ranges of R factors. *J. gen. Microbiol.* 70. 453.
- DAZZO, F.B., HUBBELL, D.N. 1975. Cross-reactive antigens and lectin determinants of host specificity in the Rhizobium-clover association. *Appl. Microbiol.* 30. 1017.
- DAZZO, F.B., YANKE, W.E., BRILL, W.J. 1978. Trifolin: A Rhizobium recognition protein from white clover. *Biochim. Biophys. Acta* 539. 276.
- de LEY, J. RASSEL, A. 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium. *J. gen. Microbiol.* 41. 85.
- de LEY, J. 1968. DNA base composition and hybridisation in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6. 63.
- DEMEREK, M., ADELBERG, E.A., CLARK, A.J., HARTMAN, P.E. 1966. A proposal for uniform nomenclature in Bacterial Genetics. *Genetics.* 54. 61.
- DENARIE, J., TRUCHET, G. 1974. Genetics of Rhizobium: a short survey. *Proc. 1st. Int. Symp. Nitrogen Fixation.* ed. Newton. Nyman. Washington State Univ. Press. p. 343.
- DENARIE, J., TRUCHET, G., BERGERON, B. 1976. Effects of some mutations on symbiotic properties of Rhizobium. En "*Symbiotic nitrogen fixation in plants*". ed. Nutman. Cambridge University Press. p. 47.
- DILWORTH, M.J., WILLIAMS, D.C. 1967. Nucleic acid changes in bacteroids of Rhizobium lupini during nodule development. *J. gen. Microbiol.* 48. 31.

- DILWORTH, M.J., PARKER, C.A. 1969. Development of the nitrogen-fixing system in legumes. *J. theoret. Biol.* 25. 208.
- DILWORTH, M.J. 1974. Dinitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25. 81.
- DIXON, R.A., POSTGATE, J.R. 1971. Transfer of nitrogen fixation genes by conjugation in Klebsiella pneumoniae. *Nature*. 234. 47.
- DIXON, R.A., POSTGATE, J.R. 1972. Genetic transfer of nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae to E. coli. *Nature* 237. 102.
- DIXON, R.A. 1974. Construction of an F-prime factor and derivative plasmids carrying the nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae. *Heredity* 33. 134.
- DIXON, R.A., CANNON, F.C., KONDOROSI, A. 1976. Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae. *Nature* 260. 268.
- DIXON, R.A., KENNEDY, C.K., KONDOROSI, A., KRISHANAPILLAI, V., POSTGATE, J.R. 1977. Genetic analysis of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. En "Recent developments in nitrogen fixation". ed. Newton. Postgate. Rodriguez-Berruenco. Academic Press. p. 337.
- DOBEREINER, J., DAY, J., DART, P.J. 1973. Rhizosphere association between grasses and nitrogen-fixing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 5. 157.
- DUNICAN, L.K., CANNON, F.C. 1971. The genetic control of symbiotic properties in Rhizobium: evidence for plasmid control. *Plant and Soil. Special Vol.* 73.
- DUNICAN, L.K., TIERNEY, A.B. 1973. Transformation of an R-Factor from Pseudomonas aeruginosa into Rhizobium trifolii. *Molec. gen. Genet.* 126. 187.

- DUNICAN, L.K., TIERNEY, A.B. 1974. Genetic transfer Nitrogen fixation from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 57. 62.
- DUNICAN, L.K., O'GARA, F., TIERNEY, A.B. 1976. Plasmid control of effectiveness in Rhizobium: transfer of nitrogen fixing genes on a plasmid from Rhizobium trifolii to Klebsiella aerogenes. En "*Symbiotic nitrogen fixation in plants*". ed. Nutman. Cambridge University Press. p. 77.
- FERRY, R., BLANCHERE, H., OBATON, M. 1959. Un milieu de culture synthetique pour R. meliloti. *Ann. Agron.* 10. 219.
- FRED, E.B., BALDWIN, I.L., McCOY, E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. *University of Wisconsin Press*.
- GIBBINS, A.M., GREGORY, K.F. 1972. Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species determined by three methods of nucleic acid hybridisation. *J. Bacteriol.* 111. 129.
- GRAHAM, P.H. 1964. The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. *J. gen. Microbiol.* 35. 511.
- GRAHAM, P.H. 1976. Identification and classification of root nodule bacteria. En "*Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*". ed. Nutman. Cambridge University Press. p. 99.
- GRIFFITH, F. 1928. Significance of pneumococcal types. *J. Hygiene.* 27. 113.
- HAAS, D., HOLLOWAY, B.W. 1976. R factor variants with enhanced sex factor activity in Pseudomonas aeruginosa. *Molec. gen. Genet.* 144. 243.
- HARRIGAN, W.G., McCANCE, H.J. 1969. Laboratory methods in microbiology. *Academic Press*.

- HAYES, W. 1968. The genetics of bacteria and their viruses. 2^a edición. Blackwell.
- HEDGES, R.W., JACOB, A.E. 1974. Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Molec. gen. Genet.* 132. 31.
- HEFFRON, F., RUBENS, C., FALKOW, S. 1975. Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance: Molecular nature and specificity of insertion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72. 3623.
- HEFFRON, F., RUBENS, C., FALKOW, S. 1977. Transposition of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance: general description and epidemiologic considerations. En "DNA insertion elements, plasmids and episomes". ed. Bukhari. Shapiro. Adhya. Cold Spring Harbor. p. 151.
- HENDRY, G.S., JORDAN, D.C. 1969. Ineffectiveness of viomycin-resistant mutants of Rhizobium meliloti. *Can. J. Microbiol.* 15. 671.
- HERNALSTEENS, J.P., VILLARROEL-MANDIOLA, R., VAN MONTAGU, M. SCHELL, J. 1977. Transposition of Tn1 to a broad-host-range drug resistance plasmid. En "DNA insertion elements, plasmids and episomes". ed. Bukhari. Shapiro. Adhya. Cold Spring Harbor. p. 179.
- HEUMANN, W. 1968. Conjugation in starforming Rhizobium lupini. *Molec. gen. Genet.* 102. 132.
- HEUMANN, W., PUHLER, A., WAGNER, E. 1971. The two transfer regions of the Rhizobium lupini conjugation. I. Fertility factor elimination and one way transfer. *Molec. gen. Genet.* 113. 308.
- HEUMANN, W., PUHLER, A., WAGNER, E. 1973. The two transfer regions

- of the Rhizobium lupini conjugation. II. Genetic characterization of the transferred chromosomal segments. *Molec. gen. Genet.* 126. 267.
- HEUMANN, W., KAMBERGER, W., PUHLER, A., ROSCH, A., SPRINGER, R. BURKARDT, H.J. 1974. Conjugation and transduction in Rhizobium lupini. *Proc. 1st. Int. Symp. Nitrogen Fixation.* ed. Newton. Nyman. Washington State Univ. Press. p. 383.
- HEUMANN, W., SPRINGER, R. 1977. Formation of merodiploid clones by conjugation in Rhizobium lupini. *Molec. gen. Genet.* 150. 73.
- HEWITT, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Tech. Comm.* 22. Commonwealth Agric. Bureau.
- HIGASHI, S. 1967. Transfer of clover infectivity of R. trifolii to R. phaseoli as mediated by an episomic factor. *J. gen. appl. Microbiol.* 13. 391.
- HOLL, F.B., LaRUE, T.A. 1974. Genetics of legume plant hosts. *Proc. 1st. Int. Symp. Nitrogen Fixation.* ed. Newton. Nyman. Washington State Univ. Press. p. 391.
- HOLLIDAY, R. 1956. Amino acid, vitamins and purine/pyrimidine pools used in the determination of auxotrophic requirements. *Nature.* 178. 1987.
- HOLSTEN, R.D., BURNS, R.C., HARDY, R.W.F., HEBERT, R. 1971. Establishment of symbiosis between Rhizobium and plant cells in vitro. *Nature.* 232. 173.
- HOYKAAS, P.J.J., KLAPWIJK, P.M., NUTI, M.P., SCHILPEROORT, R.A., RORSCH, A. 1977. Transfer of the Agrobacterium tumefaciens TI plasmid to avirulent agrobacteria and to Rhizobium ex planta. *J. gen. Microbiol.* 98. 477.

- HORVATH, J., BARABAS, I., SIK, T. 1977. A resident plasmid in Rhizobium meliloti. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 24. 6. Resumen.
- HOTCHKISS, R.D. 1954. Cyclical behaviour in pneumococcal groups and transformability occasioned by bacterial changes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 40. 49.
- HUMPHREY, B.A., VINCENT, J.M. 1963. Polysaccharide fractions and transformations in Rhizobium. *Nature.* 199. 927.
- IMSHENETSKII, A.A., PARIJSKAYA, A.N. 1973. Production of mutants of Rhizobium trifolii with modified specificity. *Microbiology.* 42. 298.
- JACOB, A.E., CRESSWELL, J.M., HEDGES, R.W., COETZEE, J.N., BERINGER, J.E. 1976. Properties of plasmids constructed by the in vitro insertion of DNA from Rhizobium leguminosarum or Proteus mirabilis into RP4. *Molec. gen. Genet.* 147. 315.
- JACOB, F., WOLLMAN, E. 1961. Sexuality and the genetics of bacteria. *Academic Press*.
- JACOBY, G.A., JACOB, A.E. 1977. Recombination between Pseudomonas aeruginosa plasmids of incompatibility groups P1 and P2. En "DNA insertion elements, plasmids and episomes". ed. Bukhari. Shapiro. *Adhya. Cold. Spring Harbor.* p. 147.
- JIMENEZ SANCHEZ, A. 1974. Mutagénesis y replicación en células de E. coli tratadas con bajas concentraciones de Nitrosoguanidina. *Tesis Doctoral. Univ. Sevilla*.
- JOHNSON, E.M., PLACEK, B.P., SNELLING, N.J., BARON, L.S. 1975. Conservation of Salmonella typhimurium deoxyribonucleic acid by chromosomal insertion in a partially diploid Escherichia coli hybrid. *J. Bacteriol.* 123. 1.

- JOHNSTON, A.W.B., SETCHELL, S.M., BERINGER, J.E. 1978. Interespecific crosses between Rhizobium leguminosarum and R. meliloti: Formation of haploid recombinants and of R-primes. *J. gen. Microbiol.* 104. 209.
- KAUSHIK, B.D., VENKATARAMAN, G.S. 1972. Induced variation in microorganisms. III. Genetic transfer between intact cells of the mutants of R. trifolii. *Folia Microbiologica.* 17. 393.
- KERN, H. 1969. Interspezifische transformation zwischen Agrobacterium tumefaciens und Rhizobium leguminosarum. *Arch. Mikrobiol.* 66. 63.
- KLECZKOWSKA, J. 1950. A study of phage-resistant mutants of Rhizobium trifolii. *J. gen. Microbiol.* 4. 298.
- KLECZKOWSKA, J. 1965. Mutations in symbiotic effectiveness in Rhizobium trifolii caused by transforming DNA and other agents. *J. gen. Microbiol.* 40. 377.
- KLEIN, G.E., JEMISON, P., HAAK, R.A., MTHYSSE, A.G. 1975. Physical evidence of a plasmid in Rhizobium japonicum. *Experientia.* 31. 352.
- KOCH, B., EVANS, J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.* 41. 1748.
- KONDOROSI, A., BARABAS, I., SVAB, Z., OROSZ, L., SIK, T. 1973. Evidence for common genetic determinants for nitrogenase and nitrate reductase in Rhizobium meliloti. *Nature New Biology.* 246. 153.
- KONDOROSI, A., OROSZ, L., SVAB, Z., SIK, T. 1974. Genetic studies on rhizobiophage 16-3. II. Helper-induced transfection. *Molec. gen. Genet.* 132. 153.

- KONDOROSI, A., KISS, G.B., FORRAI, T., VINCZE, E., BANFALVI, Z.
1977. Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome.
Nature. 268. 525.
- KOWALSKI, M. 1966. Lysogeny in Rhizobium meliloti. *Acta Microbiol.
Pol.* 15. 119.
- KOWALSKI, M. 1967. Transduction in Rhizobium meliloti. *Acta.
Microbiol. Pol.* 16. 7.
- KOWALSKI, M. 1970. Genetic analysis by transduction of Rhizobium
meliloti mutants with changed symbiotic activity. *Acta.
Microbiol. Pol. Ser. A.* 2. 115.
- KOWALSKI, M. 1971. Transduction in Rhizobium meliloti. *Plant and
Soil. Special Vol.* 63
- KOWALSKI, M. DENARIE, J. 1972. Transduction d'un gène controlant
l'expression de la fixation de l'azote chez Rhizobium meli-
loti. *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.* 275. 141.
- KOWALSKI, M. 1976. Transduction of effectiveness in Rhizobium
meliloti. En "*Symbiotic nitrogen fixation in plants*". ed.
Nutman. Cambridge University Press. p. 63.
- KRASSILNIKOV, N.A. 1941. Variation in nodule bacteria. *C.R. Acad.
Sci. URSS.* 31. 90.
- KRASSILNIKOV, N.A. 1945. Grafting of new virulence properties by
nodule and certain non-nodule bacteria. *Mikrobiologiya.* 14.
230.
- KRSMANOVIC-SIMIC, D., WERQUIN, M. 1973. Etude des bacteriophages
de Rhizobium meliloti. *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.* 276.
2745.
- KURZ, W.G.W., LaRUE, T.A. 1975. Nitrogenase activity in rhizobia
in absence of plant host. *Nature.* 256. 407.

- KURZ, W.G.W., ROKOSH, D.A., LaRUE, T.A. 1975. Enzymes of ammonia assimilation in Rhizobium leguminosarum bacteroids. *Can. J. Microbiol.* 21. 1009.
- LACEY, G.H., LEARY, J.V. 1976. Plasmid-mediated transmission of chromosomal genes in Pseudomonas glycinea. *Genet. Res. Camb.* 17. 363.
- LANGE, R.T., ALEXANDER, M. 1961. Anomalous infections by Rhizobium. *Can. J. Microbiol.* 7. 959.
- LEDERBERG, J. 1949. Aberrant heterozygotes in Escherichia coli. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 35. 178.
- LEDOUX, L. editor. 1975. Genetic manipulations with plant material. *NATO Advances Studies. Serie A. vol. 3*. Plenum Press.
- LENNOX, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology.* 1. 190.
- LIM, G. 1963. Studies on the physiology of nodule formation. VIII. The influence of the size of the rizosphere population of nodule bacteria on root hair infection in clover. *Ann. Bot.* 27. 55.
- LJUNGRÉN, H. 1961. Transfer of virulence in Rhizobium trifolii. *Nature.* 191. 623.
- LORKIEWICZ, Z., ZURKOWSKI, W., KOWALCZUK, E., GORSKA-MELKE, A. 1971. Mutagenesis and conjugation in Rhizobium trifolii. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 3. 101.
- LOTZ, W., MAYER, F. 1972. Isolation and characterization of a bacteriophage tail-like bacteriocin from a strain of Rhizobium. *J. Virology.* 9. 160.
- LOW, K.B. 1972. Escherichia coli K12 F-prime factors, old and new. *Bact. Rev.* 36. 587.

- LUDWIG, R.A., SIGNER, E.R. 1976. Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in Rhizobium. *Nature*. 267. 245.
- LUDWIG, R.A. 1978a. Control of nitrogen fixation and ammonium assimilation in Rhizobium 32H1. *Stenbock-Kettering Int. Symp. Nitrogen Fixation. Resumen*.
- LUDWIG, R.A. 1978b. Control of ammonium assimilation in Rhizobium 32H1. *J. Bacteriol.* 135. 114.
- LURIA, S. 1940. Méthodes statistiques appliquées á l'étude du mode d'action des ultravirus. *Ann. Inst. Pasteur.* 64. 415.
- LUYINDULA, N., TSHITENGE, G., LURQUIN, P., LEDOUX, L. 1975. Etude des plasmides de Rhizobium japonicum. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 83. 199.
- LWOFF, A. 1944. L'Evolution physiologique. *Etude des pertes de fonctions chez des microorganismes (Hermann)*.
- MacPHEE, D.G., SUTHERLAND, I.W., WILKINSON, J.F. 1969. Transduction in Klebsiella. *Nature*. 221. 475.
- MAIER, R.J., BRILL, W.J. 1976. Ineffective and non-nodulating strains of Rhizobium japonicum. *J. Bacteriol.* 127. 763.
- MAIER, R.J., BISHOP, P.E., BRILL, W.J. 1978. Transfer from Rhizobium japonicum to Azotobacter vinelandii of genes required for nodulation. *J. Bacteriol.* 134. 1199.
- MALEK, W. 1974. Relation between phage sensitivity and symbiotic properties of auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 6. 225.
- MARECKOVA, H. 1970. Transformation of infectivity in Rhizobium japonicum. *Zbl. Bakt.* 2. 125.
- MARSHALL, K.C. 1956. A lysogenic strain of Rhizobium trifolii. *Nature*. 177. 92.

- MATSUMOTO, H., TAZAKI, T. 1970. Genetic recombination in Klebsiella pneumoniae. An approach to genetic linkage mapping. *Jap. J. Microbiol.* 14. 129.
- MCCOMB, J.A., ELLIOT, J., DILWORTH, M.J. 1975. Acetylene reduction by Rhizobium in pure culture. *Nature.* 256. 409.
- MEADE, H.M., SIGNER, E.R. 1977. Genetic mapping of Rhizobium meliloti. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74. 2076.
- MERGEAY, M., TSHITENGE, G., JACQUEMIN, J.M., GERITS, Y., LEDOUX, L. 1973. Transfer génétique d'Escherichia coli K12 à Rhizobium lupini 6.2. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 81. 805.
- MEYNELL, E., DATTA, N. 1966. The relation of resistance transfer factors to the F. factor of E. coli. *Genet. Res. Camb.* 7. 134.
- MONOD, J. 1970. Le hasard et la nécessité. *Editions du Seuil. Paris. Edición Española. Barral. Barcelona. 1970.*
- NORRIS, D.O. 1967. Legumes and Rhizobium symbiosis. *Rhizobium Newsletter.* 12. 23.
- NOVICK, R.P. 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 33. 210.
- NUTI, C., LEDERBOER, A.M., LEPIDI, A.A., SCHILPEROORT, R.A. 1977. Large plasmids in different Rhizobium species. *J. gen. Microbiol.* 100. 241.
- NUTMAN, P.S. 1965. The relation between nodule bacteria and the legume host in the rizosphere and in the process of infection. En "*Ecology of Soil-Borne plant pathogens*". Ed. Baker. Synder. University of California. Press. Berkeley. p. 171.
- O'GARA, F., DUNICAN, L.K. 1973. Transformation and physical properties of an R-Factor RP4 transféréed from E. coli to

- Rhizobium trifolii. *J. Bacteriol.* 116. 1177.
- O'GARA, F., SHANMUGAM, K.T. 1976. Control of symbiotic nitrogen fixation in Rhizobia. Regulation of NH₄ assimilation. *Biochim. Biophys. Acta.* 451. 342.
- OLIVARES, J. 1964. Algunos aspectos de la simbiosis leguminosa-Rhizobium y aplicación al estudio de la misma de los anticuerpos fluorescentes. *Ars Pharm.* 5. 3.
- OLIVARES, J. 1976. Algunos aspectos de la asociación Rhizobium-leguminosa: Especificidad e infectividad. En "*Aspectos actuales de las relaciones huésped-parásito e intermicrobianas*". ed. Portolés. Baquero. Soc. Esp. Microbiol. p. 305.
- OLIVARES, J., MONTOYA, E., PALOMARES, A.J. 1977. Some effects derived from the presence of extrachromosomal DNA in R. meliloti. En "*Recent Developments in Nitrogen Fixation*". ed. Newton. Postgate. Rodriguez-Barrueco. Academic Press. p. 375.
- OLIVARES, J., CASADESUS, J., BEDMAR, E.J. Infectivity of Rhizobium meliloti as affected by extrachromosomal DNA. *Sometido a publicación*.
- OLSEN, R.H., SHIPLEY, P. 1973. Host range and properties of the Pseudomonas aeruginosa R factor R1822. *J. Bacteriol.* 113. 772.
- OTSUJI, N., SEKIGUCHI, M., IJIMA, T., TAKAGI, Y. 1959. Induction of phage formation in the lysogenic E. coli K12 by mitomycin. *Nature.* 184. 1079.
- OZEKI, H., IKEDA, H. 1968. Transduction mechanisms. *Ann. Rev. Genet.* 2. 245.
- PAGAN, J.D., CHILD, J.J., SCOWCROFT, W.R., GIBSON, A.H. 1975.

- Nitrogen fixation by Rhizobium cultured in a defined medium
Nature. 256. 406.
- PAGE, W.J., SHADOFF, H.L. 1976. Physiological factors affecting transformation of Azotobacter vinelandii. *J. Bacteriol.* 125. 1088.
- PAGE, W.J. 1978. Transformation of Azotobacter vinelandii strains unable to fix nitrogen with Rhizobium spp. DNA. *Can. J. Microbiol.* 24. 209.
- PALOMARES, A. 1975. Estudio sobre la producción de poligalacturonasa en la asociación Rhizobium-leguminosa. *Tesis Doctoral. Univ. Granada*.
- PALOMARES, A., MONTOYA, E., OLIVARES, J. 1978. Induction of polygalacturonase production in legume roots as a consequence of extrachromosomal DNA carried by Rhizobium meliloti. *Microbios. en prensa*.
- PANKURST, C.E., SCHWINGHAMER, E.A., BERGERSEN, F.J. 1972. The structure and acetylene-reducing activity of root nodules formed by a riboflavin-requiring mutant of Rhizobium trifolii. *J. gen. Microbiol.* 70. 161.
- PARIJSKAYA, A.N. 1973. Effect of acridine orange and mitomycin C on symbiotic properties of Rhizobium meliloti. *Microbiology*. 42. 119.
- PARKER, C.A. 1957. Evolution of nitrogen-fixing symbiosis in higher plants. *Nature*. 179. 593.
- PETERSON, E. SINHA, R.C. 1977. Uptake, distribution and persistence of tetracyclin antibiotics in various plant species susceptible to Mycoderma infection. *Phytopathol. Zeitschr.* 90. 250.
- POSTGATE, J.R., editor 1971. The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen fixation. *Plenum Press*.

- POSTGATE, J.R. 1974. Evolution within nitrogen-fixing systems. En "Evolution of microbial world". Symp. Soc. gen. Microbiol. 24. 263.
- POSTGATE, J.R. 1977. Possibilities for the enhancement of biological nitrogen fixation. *Phil. Trans. R. Soc. London.* 281. 249.
- POSTGATE, J.R., KRISHNAPILLAI, V. 1977. Expression of Klebsiella nif and his genes in Salmonella typhimurium. *J. gen. Microbiol.* 98. 379.
- PRIVAL, M.J., MAGASANIK, B. 1971. Resistance to catabolic repression of histidase and proline oxidase during nitrogen limited growth of Klebsiella pneumoniae. *J. Biol. Chem.* 246. 6288.
- PUHLER, A. 1972. Die Bereitschaft zum Gentransfer in der Rhizobium lupini Konjugation. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 220. 343.
- PUHLER, A., BUEKARDT, H.J., MATTES, R.E., HEUMANN, W. 1974. Genetische Untersuchungen an Resistenzfaktoren der Klasse P in Rhizobium lupini. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 228. 168.
- PUHLER, A., BURKARDT, H.J. 1978. Fertility inhibition in Rhizobium lupini by the resistance plasmid RP4. *Molec. gen. Genet.* 162. 163.
- PURCHASE, H.F., NUTMAN, P.S. 1957. Studies on the physiology of nodule formation. VI. The influence of bacterial numbers in rhizosphere on nodule initiation. *Ann. Bot.* 21. 439.
- RAINA, J.L., MODI, V.V. 1969. Genetic transformation in Rhizobium. *J. gen. Microbiol.* 57. 125.
- RAINA, J.L., MODI, V.V. 1971. Further studies on genetic transformation in Rhizobium. *J. gen. Microbiol.* 65. 161.

- RAINA, J.L., MODI, V.V. 1972. Deoxyribonucleate binding and transformation in Rhizobium japonicum. *J. Bacteriol.* 11. 356.
- REIJNDERS, L. 1976. The origin of endosymbiotic nitrogen fixation by Rhizobium. *J. theoret. Biol.* 61. 245.
- RICHMOND, M.H., WIEDEMAN, B. 1974. Plasmid and Bacterial evolution. *Symp. Soc. gen. Microbiol.* 124. 59.
- RIGAUD, J., PUPPO, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. gen. Microbiol.* 88. 223.
- ROBERTSON, J.G., WARBURTON, M.P., FARNDEN, 1975. Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. *FEBS Letters*, 55. 33.
- ROSLYCKY, E.B. 1967. Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. *Can. J. Microbiol.* 13. 431.
- SALMOND, G.P.C., PRIMROSE, S.B. 1976. Lysogeny in Rhizobium trifolii. *Proc. Soc. gen. Microbiol.* 4. 43. Resumen.
- SCOWCROFT, W.R., GIBSON, A.H. 1975. Nitrogen fixation by Rhizobium associated with tobacco cowpea cell cultures. *Nature*. 253. 351.
- SHELL, J., VAN MONTAGU, M. 1977. The TI plasmid of Agrobacterium tumefaciens, a natural vector for the introduction of nif genes in plants. En "*Genetic engineering for nitrogen fixation*". ed. Hollaender *et al.* Plenum press. p. 159.
- SCHERRER, A., DENARIE, J. 1971. Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti and of their prototrophic revertants. *Plant and Soil. Special Vol.* 39.

- SCHOFFL, F., WUNDER, M., TUCHER, R., HEUMANN, W., PUHLER, A.
1974. Regulation des chromosomalen transfer bei Rhizobium lupini. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 228. 155.
- SCHWINGHAMER, E.A., REINHARDT, D.J. 1963. Lysogeny in R. leguminosarum and R. trifolii. *Aust. J. Biol. Sci.* 16. 597.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1964. Host-controlled modification of Rhizobium bacteriophages. *Aust. J. Biol. Sci.* 18. 333.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1966. Factors affecting phage-restricting ability in Rhizobium leguminosarum strain L4. *Can. J. Microbiol.* 12. 395.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1968. Loss of effectiveness and infectivity in mutants of Rhizobium resistant to metabolic inhibitors. *Can. J. Microbiol.* 14. 355.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1969. Mutation to auxotrophy and prototrophy as related to symbiotic effectiveness in Rhizobium leguminosarum and R. trifolii. *Can. J. Microbiol.* 15. 611.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1970. Requirement for riboflavin for effective symbiosis on clover by an auxotrophic mutant of Rhizobium trifolii. *Aust. J. Biol. Sci.* 23. 1187.
- SCHWINGHAMER, E.A., DUDMAN, W.F. 1973. Evaluation of Spectinomycin Resistance as a marker for ecological studies with Rhizobium spp. *J. appl. Bacteriol.* 36. 263.
- SCHWINGHAMER, E.A., PANKHURST, C.E., WHITFIELD, P.R. 1973. A phage-like bacteriocin of Rhizobium trifolii. *Can. J. Microbiol.* 19. 359.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1977. Genetic aspects of nodulation and nitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. En "*Dinitrogen Fixation*". ed. Hardy. Silver. Wiley Interscience.

- SCHWINGHAMER, E.A. 1975. Properties of some bacteriocins produced by Rhizobium trifolii. *J. gen. Microbiol.* 91. 403.
- SEN, M., PAL, K.T., SEN, S.P. 1969. Intergeneric transformation between Rhizobium and Azotobacter. *Ant. van. Leeuw.* 35. 533.
- SHAH, V.K., DAVIS, L.C., GORDON, J., ORME-JOHNSON, W.H., BRILL, W.J. 1973. Nitrogenase III. Nitrogenaseless mutants of Azotobacter vinelandii: Activities, cross-reactions and EPR spectra. *Biochim. Biophys. Acta.* 292. 246.
- SHANMUGAM, K.T., LOO, A.S., VALENTINE, R.C. 1974. Deletion mutants of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. Mapping of a cluster of nif genes essential for nitrogenase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 338. 545.
- SHANMUGAM, K.T., STREICHER, S.L., MORANDI, C., AUSUBEL, F., GOLDSBERG, R.B., VALENTINE, R.C. 1974. Model for genetic regulation of dinitrogen fixation nif in Klebsiella pneumoniae. *Proc. 1st. Int. Symp. Nitrogen Fixation.* ed. Newton Nyman. Washington State Univ. Press. p. 313.
- SHANMUGAM, K.T., VALENTINE, R.C. 1975. Molecular biology of nitrogen fixation. *Science.* 187. 919.
- SHANMUGAM, K.T., MORANDI, C. 1976. Aminoacids a repressors of nitrogenase symbiothesis in Klebsiella pneumoniae. *Biochim. Biophys. Acta.* 437. 322.
- SHANMUGAM, K.T., VALENTINE, R.C. 1976. Genetic analysis of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. En "*Symbiotic nitrogen fixation in plants*". ed. Nutman. Cambridge University Press. p. 25
- SHANMUGAM, K.T., O'GARA, ANDERSEN, K., MORANDI, C., VALENTINE, R.C. 1977. Genetic control of nitrogen fixation (nif). En

- "Recent developments in nitrogen fixation". ed. Newton. Postgate. Rodriguez-Barrueco. Academic Press. p. 321.
- SIDLOI-LUMBROSO, R., KLEIMAN, L., SCHULMAN, H.M. 1978. Biochemical evidence that leghaemoglobin genes are present in the soybean but not in Rhizobium genome. *Nature*. 273. 558.
- SILVER, W.S., POSTGATE, J.R. 1973. Evolution of symbiotic nitrogen fixation. *J. theoret. Biol.* 40. 1.
- SIK, T., OROSZ, L. 1971. Chemistry and genetic Rhizobium meliloti phage 16-3. *Plant and Soil. Special Vol.* 57.
- STANIEWSKI, R. 1970. Typing of Rhizobium by phages. *Can. J. Microbiol.* 16. 1003.
- STANIEWSKI, R., LORKIEWICZ, Z. 1971. Transfection of Rhizobium meliloti. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 3. 97.
- STANIEWSKI, R., JURZYK, I., LORKIEWICZ, Z. 1973. Typing of Rhizobium trifolii mutants by means of Phages. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 5, 21.
- STANIEWSKI, R., RUGALA, A. 1975. Frequency of infection and efficiency of transfection of Rhizobium meliloti cells and spheroplasts. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 8. 151.
- STANISICH, V.A., HOLLOWAY, B.W. 1971. Chromosome transfer in Ps. aeruginosa mediated by R-factors. *Genet. Res. Camb.* 17. 169.
- STENT, G.S. 1973. Molecular genetics. Freedman. Co. Edición española: Omega.
- STEWART, W.D'P., editor. 1975. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Cambridge Univ. Press .
- ST. JOHN, SHAH, V.K., BRILL, W.J. 1974. Regulation of nitrogenase

- synthesis by oxygen in Klebsiella pneumoniae. *J. Bacteriol.* 119. 266.
- STREICHER, S.L., GURNEY, E.G., VALENTINE, R.C. 1971. Transduction of the nitrogen fixation genes in Klebsiella pneumoniae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68. 1174.
- STREICHER, S.L., GURNEY, E., VALENTINE, R.C. 1972. The nitrogen-fixation genes. *Nature.* 239. 495.
- STREICHER, S.L., SHANMUGAM, K.T., AUSUBEL, F., MORANDI, C., GOLDSBERG, R.B. 1974. Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. Evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. *J. Bacteriol.* 120. 815.
- SVAB, Z., OROSZ, L., KONDOROSI, A., SIK, T. 1973. Study of a specially transducing Rhizobium phage. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 20. 24.
- SVAB, Z., KONDOROSI, A., OROSZ, L. 1978. Specialized transduction of a cysteine marker by Rhizobium meliloti phage 16-3. *J. gen. Microbiol.* 106. 321.
- SWEENEY, G.C., 1974. Technology and economics of ammonia production. *Proc. 1st. Int. Symp. Nitrogen Fixation.* ed. Newton. Nyman. Washington State Univ. Press. p. 648.
- SYKES, R.B., RICHMOND, R.H. 1970. Intergeneric transfer of a β -lactamase gene between Ps. aeruginosa and E. coli. *Nature.* 226. 952.
- SZENDE, K., ORDOGH, F. 1960. Die Lysogenie von Rhizobium meliloti. *Naturwissenschaften.* 47. 404.
- SZENDE, K., SIK, T., ORDOGH, F., GYORFFY, B. 1961. Transfer of immunity by nucleic acids of a lysogenic Rhizobium strain. *Biochim. Biophys. Acta.* 47. 215.

- SZENDE, K. 1971. Genome structures in a lysogenic Rhizobium meliloti system. *Plant and Soil. Special Vol.* 81.
- TAKAHASHI, I., QUADLING, C. 1961. Lysogeny in Rhizobium trifolii. *Can. J. Microbiol.* 7. 455.
- TAYLOR, A.L., ADELBERG, E.A. 1961. Evidence for a closed linkage group in Hfr males of Escherichia coli K12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 5. 400.
- TAYLOR, A.L., TROTTER, C.D. 1972. Linkage map of E. coli. *Bacteriol. Rev.* 36. 504.
- 't MANNETJE, L. 1967. A re-examination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis. *Ant. van Leeuw.* 33. 477.
- TOWNER, K.J., VIVIAN, A. 1976. RP-4-mediated conjugation in Acinetobacter calcoaceticus. *J. gen. Microbiol.* 93. 335.
- TRINICK, M.J. 1973. Symbiosis between Rhizobium and the nonlegume Trema aspera. *Nature.* 244. 459
- TRONICK, S.R., CIARDI, J.E., STADTMAN, 1973. Comparative biochemical and immunological studies of bacterial glutamine synthetases. *J. Bacteriol.* 115. 858.
- TRUCHET, G., DENARIE, J. 1973a. Structure et activité réductrice d'acétylène des nodules de luzerne (Medicago sativa L.) induits par des mutants de Rhizobium meliloti auxotrophes pour l'adénine et pour l'uracile. *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.* 277. 841.
- TRUCHET, G., DENARIE, J. 1973b. Ultrastructure et activité réductrice d'acétylène des nodosités de luzerne (Medicago sativa L.) induites par des souches de Rhizobium meliloti auxotrophes pour la leucine. *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.* 277. 925.

- TSHITENGE, G., LUYINDULA, N., LURQUIN, P.F., LEDOUX, L. 1975. Plasmid deoxyribonucleic acid in Rhizobium vigna and Rhizobium trifolii. *Biochim. Biophys. Acta.* 414. 357.
- TUBB, R.S. 1976. Regulation of nitrogen fixation in Rhizobium sp. *Appl. Environm. Microbiol.* 32. 483.
- VANDECAVEYE, S.C., KATZNELSON, H. 1936. Bacteriophage as related to the root nodule bacteria of alfalfa. *J. Bacteriol.* 31. 465.
- VERMA, D.P.S., NASH, D.T., SCHULMAN, H.M. 1974. Isolation and in vitro translation of soybean leghaemoglobin mRNA. *Nature.* 251. 74.
- VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of Root-nodule Bacteria. *IBP Handbook. n°15 Blackwell.*
- WATANABE, T. 1963. Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. VI. High frequency resistance transfer system in E. coli. *J. Bacteriol.* 85. 788.
- WILSON, P.W., HULL, J.F., BURRIS, R.H. 1943. Competition between free and combined nitrogen in nutrition of Azotobacter. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 29. 289.
- WINKLER, U., RUGER, W., WACKERNAGEL, W. 1976. Bacterial, phage and molecular genetics. *Springer-Verlag.*
- WOLPERT, J.S., ALBERSHEIM, P., 1976. Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the antigen-0 containing lipopolysacharides of their symbiont Rhizobia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 70. 729.
- WU, T.T. 1966. A model for three-point analysis of random general transduction. *Genetics.* 54. 405.
- ZAENEN, I., van LAREBEKE, N., TEUCHY, H., van MONTAGU, M., SCHELL, J. 1974. Supercoiled, circular DNA in crown gall inducing

- Agrobacterium strains. *J. molec. Biol.* 86. 109.
- ZAMENHOF, S., EICHORN, H.H. 1967. Study of Microbial evolution through loss of biosynthetic functions. *Nature*. 216. 456.
- ZELAZNA, I. 1963. Transformation of Rhizobium. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 12. 166.
- ZELAZNA, I. 1964. Transformation in Rhizobium trifolii. II. Development of competence. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 13. 291.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I. 1971. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in Rhizobium trifolii. *Plant and Soil. Special Vol.* 67.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I., LORKIEWICZ, Z. 1971. Transformation in Rhizobium trifolii. IV. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in Rhizobium trifolii. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 3. 11.
- ZURKOWSKI, W., HOFFMANN, M., LORKIEWICZ, Z. 1973. Effect of ancriflavine and sodium dodecyl sulphate on infectiveness of Rhizobium trifolii. *Acta Microbiol. Pol. Ser. A.* 5. 55.
- ZURKOWSKI, W., LORKIEWICZ, Z. 1976. Plasmid deoxyribonucleic acid in Rhizobium trifolii. *J. Bacteriol.* 128. 481.
- ZURKOWSKI, W., LORKIEWICZ, Z. 1977. Bidirectional replication of the chromosome in Rhizobium trifolii. *Molec. gen. Genet.* 156. 215.