

4/60

~~F. S. 16/63~~

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613386918
Nº Copia 15492187

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Adquisición de genes por cepas de *Rhizobium*
utilizadas como inoculantes desde bacterias nativas del
suelo.**

Pablo José Villadas Latorre

**TESIS DOCTORAL
1996**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 JUN. 1986
COMISION DE...
9

**Adquisición de genes por cepas de
Rhizobium utilizadas como inoculantes desde
bacterias nativas del suelo.**

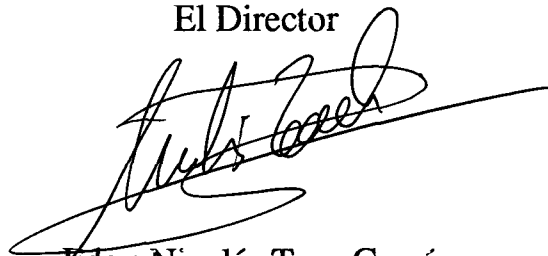
Memoria que presenta el licenciado en Ciencias
Biológicas Don Pablo José Villadas Latorre
para aspirar al grado de Doctor.



Fdo.: Pablo José Villadas Latorre

Vº Bº

El Director



Fdo.: Nicolás Toro García
Doctor en Ciencias Biológicas
Colaborador Científico del C.S.I.C.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín como desarrollo de los Proyectos de Investigación BIO93-0677 de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y BIO2CT92-0370 de U. E. BIOTECH.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral pueden consultarse en las siguientes revistas:

-Villadas, P.J., Burgos, P., Jording, D., Selbitschka, W., Pühler, A & Toro, N. 1996. Comparative analysis of the genetic structure of a *Rhizobium meliloti* field population before and after environmental release of the highly competitive *R. meliloti* strain GR4. FEMS Microbiol. Ecol. En prensa.

-Villadas, P.J., Velázquez, E., Martínez-Molina, E. & Toro, N. 1995. Identification of nodule-dominant *Rhizobium meliloti* strains carrying pRmeGR4b type plasmid within indigenous soil populations by PCR using primers derived from specific DNA sequences. FEMS Microbiol. Ecol. **17**: 161-168.

INDICE

INTRODUCCION	1
1.-Inoculantes y métodos de inoculación	5
2.-Seguimiento de la cepa liberada	7
2.1.-Resistencia a antibióticos	8
2.2.-Genes <i>lacYZ</i> .	9
2.3.-Gen <i>xylE</i>	9
2.4.- (2,4)-diclorofenoxiacetato (TFD) monooxigenasa	9
2.5.-Gen <i>gusA</i> .	9
2.6.-Bioluminiscencia	10
3.-Nuevas metodologías en la identificación de microorganismos	11
3.1.-Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	11
3.2.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
3.3.-Distribución de secuencias de inserción ("IS-fingerprints")	14
4.-La simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	16
4.1.-Factores que afectan a la competitividad	18
4.2.-Cepas rizobianas y leguminosas con su rango de huésped modificado	20
4.3.-Genes y características de las bacterias implicados en competitividad	23
4.3.1.-Bacteriocinas	23
4.3.2.-Superficie celular	23
4.3.3.-Motilidad	24
4.3.4.-Velocidad de nodulación	24
4.3.5.-Rizopinas	24
4.3.6.-Genes <i>nfe</i>	25
4.3.7.-Prolina deshidrogenasa	25
4.4.-Colonización y supervivencia del inóculo	25
5.-Transferencia de material genético en el ecosistema natural	27
5.1.-Transformación	27

5.2.-Transducción	28
5.3.-Conjugación	28
6.-Sistemas contenedor	30
6.1.-Sistemas suicida	31
6.2.-Cepas atenuadas	32
6.3.-Vectores retrovirales	33
6.4.-Mutaciones en genes esenciales en situaciones de estrés	33

OBJETIVOS DEL TRABAJO 34

MATERIAL Y METODOS 36

1.-Cepas bacterianas y plásmidos	37
2.-Medios de cultivo y de conservación	37
2.1.-Medios para Rhizobiaceae	37
2.2.-Medios para <i>E. coli</i>	40
2.3.-Medios de conservación	40
3.-Antibióticos	41
4.-Preparación de células competentes y transformación de <i>E.coli</i>	41
5.-Ensayos con plantas	42
5.1.-Plantas	42
5.2.-Colecciones infectivas de <i>R. meliloti</i> y <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> de la EEZ	42
5.3.-Solución nutritiva	43
5.4.-Esterilización y germinación de semillas	43
5.5.-Cultivo axénico de plantas de alfalfa	44
5.6.-Inoculación de las plantas	44
5.7.-Reaislamiento de <i>Rhizobium</i> de los nódulos	45
5.8.-Medida de la competitividad para la nodulación de la cepa GR4SS	45
6.-Minipreparación de plásmidos	46
7.-Aislamiento de ADN total	47
8.-Determinación de las concentraciones de ADN y oligonucleótidos	48
9.-Preparación de lisados celulares	48
10.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
11.-Manipulación enzimática de ADN	51
11.1.-Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción	51

11.2.-Purificación de fragmentos de PCR	52
11.3.-Ligación de fragmentos de restricción o productos de PCR	52
12.-Electroforesis de ADN	53
12.1.-Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa	53
12.2.-Revelado de geles y fotografía	53
12.3.-Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa	54
13.-Experimentos de hibridación ADN-ADN	54
13.1.-Transferencia de ADN a filtros de nylon	54
13.2.-Marcaje de sondas de ADN para hibridación	56
13.3.-Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas	56
13.4.-"IS-fingerprint"	57
13.5.-"ERIC-fingerprint"	57
14.-Secuenciación de ADN de cadena doble	57
14.1.-Preparación y marcaje del ADN	57
14.2.-Resolución de compresiones	59
14.3.-Electroforesis en gel de poliacrilamida	59
14.4.-Tratamiento y exposición del gel	60
14.5.-Secuenciación automática	60
15.-Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	62
16.-Análisis estadístico	63
17.-Ensayos de campo	63
17.1.-Preparación de <i>R. meliloti</i> GR4SS y semillas de alfalfa para la liberación	63
17.2.-Preparación del suelo y siembra de semillas	64
17.3.-Evaluación de la población de campo de <i>R. meliloti</i>	64
17.4.-Ocupación de nódulos de alfalfa	64
17.5.-Liberación de <i>S. fredii</i> HH102	65
18.-Distintas parcelas de trabajo	67

RESULTADOS Y DISCUSION	69
1.-Identificación de células infectivas de <i>Rhizobium meliloti</i> que llevan plásmidos del tipo pRmeGR4b en poblaciones nativas mediante PCR con cebadores derivados de secuencias de ADN específicas	70
1.1.-Diseño de cebadores	71
1.2.-Amplificación con cebadores derivados de elementos IS	71
1.3.-Amplificación con cebadores derivados del gen <i>repC</i> del plásmido pRmeGR4a	74
1.4.-Amplificación con cebadores derivados del sitio específico de inserción de <i>ISRm4</i> en GR4 y de los genes <i>nfe</i>	74
1.5.-Caracterización de la población nativa de <i>R. meliloti</i> de la EEZ por PCR	74
1.6.-Frecuencia de plásmidos tipo pRmeGR4b en las poblaciones nativas de <i>R. meliloti</i> de distintos suelos	78
2.-Análisis comparativo de la estructura genética de poblaciones de campo de <i>R. meliloti</i> y liberación de <i>R. meliloti</i> GR4	79
2.1.-Caracterización de la población nativa de <i>R. meliloti</i> por "ERIC-" e "IS-Fingerprinting"	81
2.2.-Comparación de los grupos de "ERIC" e "IS-Fingerprint" con la distribución de los plásmidos tipo pRmeGR4a y b	85
2.3.-Características iniciales de la población nativa de <i>R. meliloti</i> en el suelo de la EEZ y liberación de la cepa GR4	87
2.4.-Persistencia de la cepa liberada	88
2.5.-Porcentaje de nódulos ocupados por la cepa liberada	91
2.6.-Impacto de la liberación de <i>R. meliloti</i> GR4 sobre la población nativa de <i>R. meliloti</i> de la EEZ	91
3.- Identificación de elementos genéticos comomarcadores en el análisis de la adquisición de genes por cepas inoculantes desde la población autóctona del suelo	94
3.1.-Determinación de la presencia de los elementos de inserción <i>ISRm3</i> e <i>ISRm4</i> en la población de <i>R. meliloti</i> de la EEZ mediante PCR	95
3.2.-Identificación de secuencias de inserción homólogas a la <i>ISRm3</i> de <i>R. meliloti</i> en poblaciones nativas de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	95

3.3.-Secuenciación del elemento homólogo a <i>ISRm3</i> de <i>R. meliloti</i> en la cepa de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> B10 y diseño de cebadores para su reconocimiento por PCR	96
4.-Identificación de secuencias de inserción homólogas a <i>ISRm4</i> de <i>R. meliloti</i> en <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	103
4.1.-Presencia de <i>ISRm3</i> e <i>ISRm4</i> en cepas de <i>S. fredii</i>	103
4.2.-Secuenciación de elementos homólogos a <i>ISRm4</i> de <i>R. meliloti</i> en <i>S. fredii</i> HH102 y diversas cepas de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> y diseño de cebadores para su reconocimiento por PCR	105
5.-Detección de transferencia génica desde la microflora del suelo a la cepa liberada <i>S. fredii</i> HH102	111
5.1.-Análisis preliminares de nódulos de soja	111
5.2.-Liberación de <i>S. fredii</i> HH102 y análisis de nódulos procedentes de la EEZ	118
DISCUSION GENERAL	121
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFIA	131

INTRODUCCION

El gran interés que despierta la comprensión de los principios fundamentales de la ecología del suelo deriva de la urgencia por alimentar a una población en constante crecimiento, por combatir la polución y por responder al cambio climático. La liberación de microorganismos al medio ambiente, ya sea como cepas no modificadas o modificadas genéticamente (MMG) con el fin de aumentar la productividad agrícola (Stacey & Upchurch, 1984; Khachatourians, 1986; Kloepper *et al.*, 1989) o bien para eliminar contaminantes xenobióticos (Ramos & Timmis, 1987) es objeto de controvertido debate tanto en el ámbito científico como por la opinión pública.

A pesar de los beneficios potenciales que supone la utilización de MMGs (Hirsch, 1988; Short *et al.*, 1990; Cook *et al.*, 1991), su uso es todavía muy restringido debido al desconocimiento que se tiene del posible impacto negativo que la liberación de tales microorganismos podría causar en el entorno. Algunas de las liberaciones de MMGs llevadas a cabo en Europa occidental se muestran en la **Tabla 1**. Los microorganismos, una vez liberados, no sólo se multiplicarían, sino que podrían modificarse espontáneamente al estar sometidos a la presión selectiva del medio, lo que podría comprometer la conveniencia ecológica de su liberación (Tiedje *et al.*, 1989; Van Elsas *et al.*, 1989). Además la capacidad de los microorganismos para intercambiar información genética con otros microorganismos, relacionados o no taxonómicamente (Naik *et al.*, 1994), aumenta la incertidumbre respecto al destino final de estos MMGs y su efecto, o el que los nuevos elementos genéticos introducidos por ellos pueda causar sobre el ecosistema natural. Por ello, antes de cualquier liberación de MMGs deben llevarse a cabo los estudios necesarios para una mejor comprensión de la ecología e impacto medioambiental de estos microorganismos y su información genética

Tabla 1: Algunas de las liberaciones de microorganismos modificados genéticamente (MMG) llevadas a cabo en Europa occidental en los últimos años.

PAIS	CEPA	AÑO	GRUPO INVESTIGADOR
Reino Unido	<i>R. leguminosarum</i>	1987, 1994	P. Hirsch
	<i>Pseudomonas</i>	1994	R.L. Bailey J. Lynch
Francia	<i>R. leguminosarum</i> otras bacterias	1988 y siguientes 5 liberaciones desde 1990	N. Amarger
Alemania	<i>R. meliloti</i>	1995	A. Pühler
España	<i>P. putida</i>	1995	J. L. Ramos
Holanda	<i>P. fluorescens</i>		
Italia	<i>R. meliloti</i>		M. Nuti
	<i>R. leguminosarum</i>		
	<i>Pseudomonas</i> <i>Azospirillum</i>		
Irlanda	<i>R. meliloti</i>	1993	F. O'Gara

(Smit *et al.*, 1991). Se necesita, por tanto, un amplio conocimiento sobre la supervivencia microbiana, crecimiento, actividad y dispersión en el medio y la persistencia del ADN recombinante así como su posible transferencia a la microflora indígena o las posibles incorporaciones de material genético dentro de la cepa inoculada. Se hace necesario entonces detectar y cuantificar la población bacteriana, y dentro de ésta las células totales, viables, cultivables por los métodos de plaqueo convencionales y no cultivables (Edwards, 1993) para medir su actividad real y potencial y determinar la presencia y expresión de ADN recombinante en la progenie del inóculo y en microorganismos nativos.

Toda población bacteriana introducida masivamente en el suelo tiende a disminuir progresivamente a lo largo del tiempo hasta alcanzar un equilibrio o hasta llegar a desaparecer. Esta disminución es tanto más rápida cuanto más desfavorables son las condiciones del medio (textura del suelo, pH, temperatura, humedad,...) respecto a las necesidades de los microorganismos introducidos. La persistencia de los microorganismos también depende de la cantidad de inóculo introducido inicialmente; a mayor inóculo, mayor persistencia.

Un buen modelo para el estudio de los efectos asociados a la liberación de microorganismos en el suelo es la inoculación de semillas de leguminosas forrajeras o de grano (alfalfa, trébol, guisante, soja,...) con los microsimbiontes *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* buscando aumentar la productividad de los cultivos a través del incremento de la fijación biológica de nitrógeno (Vincent, 1980). Esta ha sido una práctica agrícola común desde hace más de un siglo. De la importancia económica que tiene la fijación biológica de nitrógeno por medio de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa da idea el hecho de que unos 12 millones de hectáreas de soja de los aproximadamente 42 millones que se cultivan anualmente en el mundo sean inoculadas (Catroux & Amarger, 1992) y el gran esfuerzo empleado en la construcción de cepas genéticamente manipuladas que aumenten su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno (Tiedje *et al.*, 1989).

La inoculación de suelos con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se hace normalmente en dos situaciones, por un lado para mejorar la producción de las leguminosas en suelos cuya población de rizobios nativos es muy escasa, siendo éste el factor limitante para el establecimiento de la simbiosis. Esta situación es habitual cuando se trata de introducir un nuevo cultivo de leguminosas, por ejemplo, la introducción de cultivos de

soja en el oeste de Europa, la introducción de *Rhizobium meliloti* en suelos ácidos (Obaton, 1971) o de *Bradyrhizobium* en suelos neutros o básicos (Amarger, 1980). Por otro lado, para intentar aumentar la eficiencia de la simbiosis en suelos con una población nativa de *Rhizobium* perfectamente establecida pero ineficiente. Así podemos encontrar inoculaciones de leguminosas en un amplio rango de climas, suelos y situaciones agrícolas a lo largo de todo el mundo.

1.-Inoculantes y métodos de inoculación

Los inoculantes rizobianos son cultivos bacterianos más o menos puros convenientemente empaquetados en polvo, granulados o líquidos, y de fácil uso por el agricultor (Date & Roughley, 1977; Smith, 1987; Roughley, 1988). Las cepas inoculadas, una o varias según los casos, han de estar adaptadas a las condiciones locales de suelo, clima y genotipo de planta cultivada, ya que se sabe que los rizobios varían en infectividad y efectividad y en el éxito en la nodulación y fijación de nitrógeno influenciados por las características ecológicas del medio (Israel *et al.*, 1988; Thompson, 1988). La utilización de inóculos de una o varias cepas ofrece resultados muy dispares en el caso de *R. meliloti* y alfalfa (Bordeleau & Antoun, 1977) en cuanto a productividad dependiendo del número y naturaleza de las cepas utilizadas. La utilización de inoculantes multicepa de *B. japonicum*, sin embargo, parece no ser recomendable, ya que se ha descrito que la inoculación con una única cepa produce más fijación de nitrógeno que ésta misma cepa usada en un inóculo multicepa (Rennie & Dubetz, 1984).

En el proceso de inoculación se utilizan materiales no estériles como portadores ("carriers") del inóculo, tales como turba, restos vegetales, compost, arcillas, sulfato cálcico, fosfatos,..., a los cuales se adhiere el inóculo. La turba es el sistema "carrier" más utilizado a pesar de su variabilidad por que permite muy bien la supervivencia del inóculo, aunque ésta es más baja cuando se utiliza turba no estéril (Date & Roughley, 1977). La utilización de inóculos no puros o "carriers" no estériles supone un riesgo potencial de introducción y diseminación de patógenos de humanos, animales o plantas, aunque hasta el momento no se han detectado problemas medioambientales o de salud por el uso de inóculos con estos contaminantes (Beringer & Bale, 1988), sin embargo, la mayoría de los países recogen en su legislación limitaciones en el movimiento transnacional de comida, semillas y cualquier producto que

pueda llevar patógenos, siendo necesario el seguimiento no sólo de las cepas de *Rhizobium* liberadas sino también del resto de microorganismos que acompañan al inóculo en su liberación cuando se trate de cultivos no puros. Además los controles de calidad sobre inóculos no puros son más difíciles, lentos y caros de realizar (Jansen Van Rensburg & Strijdom, 1974; Hiltbold *et al.*, 1980; Olsen & Rice, 1989).

La inoculación puede realizarse a través de las semillas, espolvoreándolas o mojándolas en el inóculo (Kremer & Peterson, 1982; Elegba & Rennie, 1984), o directamente en el suelo (Schiffman & Alper, 1968; Hely *et al.*, 1976; Brockwell, 1977; Rogers *et al.*, 1982; Boonkerd *et al.*, 1985; Ciafardini & Barbieri, 1987; Roughley, 1988). La utilización de semillas preinoculadas, aunque mucho más cómoda por estar listas para su uso, tiene la desventaja de la escasa supervivencia del inóculo sobre la semilla. La pérdida de viabilidad del inóculo puede ser de hasta dos órdenes de magnitud (Davidson & Reuszer, 1978; Bonish *et al.*, 1980; Brockwell *et al.*, 1985 y 1987). El número de nódulos generalmente aumenta con el logaritmo del número de bacterias inoculadas (Weaver & Frederick, 1972; Philpotts, 1979; Smith *et al.*, 1981; Brockwell *et al.*, 1988). Según diversos estudios, entre 10^4 y 2×10^5 parece ser el número ideal de bacterias a inocular por semilla de soja (Curley & Burton, 1975; Date & Roughley, 1977; Sicardi de Mallorca & Labandera, 1978; Hiltbold *et al.*, 1980; Skipper *et al.*, 1980).

La microflora normal de un suelo es de alrededor de 10^8 - 10^9 bacterias por gramo y el número de rizobios es de entre 10^3 - 10^5 por gramo de suelo, de esta manera el inóculo supondrá, en el mejor de los casos, del 0'1 al 10% del total de la población de rizobios.

Aunque aún no tenemos conclusiones definitivas, parece ser que hasta ahora la liberación de microorganismos en el suelo no ha causado ningún problema medioambiental (Hirsch, 1988; Kerr, 1989; Short *et al.*, 1990; Cook *et al.*, 1991; Drahos *et al.*, 1992; Lindow, 1992) si nos ceñimos a estudios sobre diseminación, supervivencia y posible transferencia génica de nuevos elementos genéticos a la comunidad microbiana nativa. En cualquier caso, sólo se ha considerado el impacto de patógenos en plantas diana en estudios de control de la actividad biológica, pero no el efecto que sobre otras plantas no diana ni su potencial disruptivo sobre la población microbiana nativa y el ecosistema en sí (Kerr, 1989; Cook *et al.*, 1991; Possee *et al.*, 1992). Los estudios en micro y mesocosmos pueden aportarnos alguna luz sobre el tema (Seidler, 1992; Stotzky *et al.*, 1993) al tener en cuenta el efecto

sobre protozoos (Austin *et al.*, 1990), el ciclo del carbono (Wang *et al.*, 1991), el desplazamiento de poblaciones nativas de *Pseudomonas* en la rizosfera (Bolton *et al.*, 1991), la supresión a lo largo del tiempo de poblaciones de hongos en el suelo (Short *et al.*, 1990) y alteraciones de los componentes cultivables de la microflora en experimentos de campo (De Leij *et al.*, 1995). Así, las cepas de laboratorio son capaces de establecerse en sistemas complejos como suelos, sedimentos de lagos y aguas de ríos. Los microorganismos introducidos en el medio normalmente no tienen un gran impacto sobre las poblaciones nativas, su establecimiento o no dentro de la microflora dependerá de la ecología y las características físico-químicas del medio elegido. No hay ninguna razón para pensar que el comportamiento de cepas manipuladas genéticamente vaya a ser distinto del comportamiento de cepas que han sido liberadas pero que no han sido manipuladas genéticamente (De Leij *et al.*, 1995). En cualquier caso, las cepas manipuladas que van a ser liberadas deben de tener alguna ventaja agrícola sobre las cepas nativas o las procedentes de anteriores liberaciones y que no estaban manipuladas. Esta ventaja debe ser fácilmente apreciable bajo las condiciones de cultivo de campo, siendo además muy importante la regulación de la calidad de los inoculantes, su título, supervivencia y pureza como parte de la estrategia de seguridad en la liberación de microorganismos al medio.

2.-Seguimiento de la cepa liberada

Tradicionalmente para la detección y aislamiento de bacterias en el suelo se han utilizado anticuerpos fluorescentes y plaqueo selectivo (Herbert, 1990), sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías de detección molecular ha incrementado la capacidad para el seguimiento e identificación de los microorganismos y marcadores genéticos en el suelo (Pickup, 1991). Las técnicas inmunológicas tradicionales han mejorado su eficiencia con la utilización de anticuerpos mono y policlonales, ensayos tipo ELISA y su aplicación a la citometría de flujo. La utilización de sondas de ácidos nucleicos implica la detección de secuencias de ADN o ARN específicas situadas al azar o asociadas a algún gen funcional (Sayler & Layton, 1990), la sensibilidad de esta metodología ha aumentado enormemente tras el uso de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente denominada "PCR" (Steffan & Atlas, 1991). Sin embargo, este tipo de técnicas no dan información sobre la viabilidad o actividad de una población específica.

Para el seguimiento de microorganismos después de haberlos introducido en el suelo también se puede utilizar un marcador selectivo que no interfiera con la capacidad de la cepa de sobrevivir ni impida el crecimiento de las plantas con las que interaccionan, si ese es el caso; el fenotipo resultante debe estar ausente en la población nativa y su eficacia dependerá de que se mantenga de forma estable en la cepa y que su expresión sea fácilmente detectable (Evguenieva *et al.*, 1994; Evguenieva-Hackenberg *et al.*, 1994). El mantenimiento del marcaje es mucho mayor si éste se ha producido en el cromosoma y no en plásmidos, además así la posibilidad de transferencia a otros microorganismos no marcados es extremadamente reducida.

Dentro de los genes y secuencias marcadoras (genes "reporter") se incluyen los genes de resistencia a metales pesados y de resistencia a antibióticos como kanamicina (Kokotek & Lotz, 1989) o con el transposon Tn5 (Frederickson *et al.*, 1988). En este último caso, sin embargo, se ha descrito (Pillai & Pepper, 1991) que su inactivación funcional en condiciones de estrés, así como su naturaleza móvil, podría causar reordenaciones genómicas haciéndolo un marcador no válido para su liberación en la naturaleza. Los marcadores de resistencia tienen la ventaja de la selección directa, sin embargo, la amplia distribución de algunas resistencias en determinadas poblaciones los hace ineficaces, además tenemos que tener en cuenta las consideraciones éticas derivadas de la liberación de microorganismos con resistencia a antibióticos o metales pesados. Como alternativa a este tipo de marcaje se usan genes cuyos productos dan reacciones colorimétricas (*lacZ*, *gusA*, *thyA*, *xylE*, *lux*, *luc*) (Selbitschka *et al.*, 1992; Prosser, 1994) o combinaciones únicas de genes. En el caso de la utilización del gen *luc*, éste permite detectar una célula marcada entre 10^5 células en placa (Cebolla *et al.*, 1993).

2.1.-Resistencia a antibióticos

Facilita la selección de la población viable del organismo marcado por plaqueo directo en medio con el antibiótico adecuado. Mediante el uso de sondas se pueden detectar también las células no cultivables marcadas. Es selectivo para la detección y enumeración de organismos marcados a concentraciones relativamente bajas. Lo mismo es aplicable al caso de genes de resistencia a drogas o metales pesados (Bale *et al.*, 1987) y herbicidas (Ramos *et al.*, 1991).

2.2.-Genes *lacZY*

Los genes *lacZY* de *E. coli* codifican para la β -galactosidasa y la correspondiente permeasa. Los microorganismos que llevan estos genes se pueden detectar en medio sólido con X-Gal (5-cloro-4-bromo-3-indolil β -D-galactopiranosido) dando un color azul. Los límites de detección oscilan en torno a 1-10 células/gr de suelo (Hofte *et al.*, 1990; Drahos *et al.*, 1992; De Leij *et al.*, 1993). Hasta el momento no se han encontrado evidencias de transferencia del marcador cromosómico a la microflora del suelo.

Su mayor inconveniente es que se requiere el cultivo en laboratorio y la selección de organismos *lac*⁺.

2.3.-Gen *xylE*

El gen *xylE* está presente en el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida* y codifica para la enzima catecol (2-3)-dioxigenasa (C230) que convierte el catecol, incoloro, en semialdehído hidroximucónico, de color amarillo. Se suele expresar, tras manipularlo genéticamente, a partir de los promotores P_L o P_R del fago lambda, no regulados o bajo el control de la proteína represora sensible a la temperatura *cI857* (Morgan *et al.*, 1989; Winstanley *et al.*, 1989 y 1991; Wipat *et al.*, 1991).

2.4.- (2,4)-diclorofenoxiacetato (TFD) monooxigenasa

Convierte el fenoxiacetato (PAA) en fenol. Esta técnica supera los problemas de sensibilidad e inestabilidad en la construcción de plásmidos. Cuando la TFD monooxigenasa está desregulada, las colonias se detectan al añadir PAA e incubando una hora para permitir la producción de fenol. Añadiendo ferrocianida potásica y 4-aminoantipirina. En las condiciones del ensayo y con pH alcalino se producirá una pigmentación roja (King *et al.*, 1991). Por este sistema se pueden detectar 10³ células por mililitro que sean incapaces de metabolizar fenol.

2.5.-Gen *gusA*

Codifica para la β -glucuronidasa de *E. coli*. En presencia de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico) da un color azulado a las colonias (Sharma & Signer, 1990), sin embargo parece que el precipitado que origina podría inhibir el crecimiento tanto de *E. coli* como de *Rhizobium*. Otro sustrato alternativo es el 4-MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucurónico), que aunque más difundible, es mucho

más barato (Gallagher, 1992). Selbitschka *et al.*, 1992, construyeron mutantes *recA* de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* por inserción de este gen. La actividad GUS en estas cepas se mantuvo durante más de 100 generaciones de cultivo en medio líquido no selectivo. La estabilidad también se mantuvo tras sucesivos pases de nodulación.

2.6.-Bioluminiscencia

La principal ventaja es la capacidad de medir la luz en tiempo real sin la extracción de células ni la invasión del organismo huésped. Sólomente se ha encontrado una bacteria luminiscente en el suelo (Schmidt *et al.*, 1989) con lo que esta técnica es particularmente útil en este sistema.

Se ha utilizado el sistema marcador de la luciferasa de luciérnaga (*luc*) para detectar *R. meliloti* en nódulos de raíz de alfalfa (Palomares *et al.*, 1989).

La emisión de luz es mayor cuando el marcaje es plasmídico y aumenta con el número de copias del plásmido y la fuerza del promotor (Amin-Hanjani *et al.*, 1993), sin embargo, el crecimiento de las células se ve retrasado si el marcaje es en el plásmido, probablemente debido al estrés metabólico que le supone a la célula su mantenimiento. En *P. fluorescens* la estabilidad del marcaje es mayor cuando este se efectúa en el cromosoma ya que la pérdida de plásmidos ocurre con una vida media de 11 generaciones y media (Rattray *et al.*, 1993). También es mayor la emisión de luz en células gram-negativas y enterobacterias que en gram-positivas. La luz puede detectarse a simple vista, con película fotográfica o de rayos X. Es posible detectar en placa una única colonia luminiscente de entre 3000 no luminiscentes. El sistema marcador por bioluminiscencia es, en el ecosistema natural, unas mil veces más sensible que la detección basada en los marcadores *lacZY*. La sensibilidad se reduce en un orden de magnitud debido a la interferencia de las partículas de suelo en este medio.

En 1988 O'Kane *et al.*, demostraron el uso de la bioluminiscencia en el estudio de las interacciones microbio-planta en la expresión de los genes *nif* de *B. japonicum* en nódulos.

La luminometría presenta varias ventajas como son la rapidez, facilidad de realización, sensibilidad y selectividad. Es un método no extractivo para la cuantificación de la actividad de células viables pero no necesariamente cultivables en el medio natural.

3.- Nuevas metodologías en la identificación de microorganismos

Recientemente se han venido desarrollando nuevos métodos de identificación basados en secuencias propias del genoma de las cepas de interés, aquí consideraremos la electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Corich *et al.*, 1991; Sobral *et al.*, 1991; Honeycut *et al.*, 1993; Huber & Selenska-Pobell, 1994 a y b; Prozorov, 1995), técnicas basadas en la "PCR" (Saiki *et al.*, 1988) y el "IS-fingerprint" (Barran *et al.*, 1994; Selbitschka *et al.*, 1995).

La amplia difusión que estas metodologías está alcanzando se debe, fundamentalmente, a la rapidez de los ensayos, la alta procesividad de muestras y la selectividad, sensibilidad y facilidad para reproducir los resultados obtenidos.

Con la combinación de estas técnicas se consiguen resoluciones taxonómicas impensables con las técnicas de identificación tradicionales.

3.1.-Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en campo pulsado es una técnica en la cual la electroforesis discurre con campos eléctricos que van alternándose al cambiar las posiciones de ánodo y cátodo cada ciertos intervalos de tiempo (Lee *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1989; Mezhevaya *et al.*, 1993). En determinadas condiciones podríamos separar fragmentos de ADN de más de 1 megabase por su diferente migración en campos eléctricos alternativos dependiendo de su longitud, configuración y masa. Se requiere el aislamiento de grandes fragmentos de ADN y, por tanto, la utilización de un método de lisis suave, dentro incluso del mismo pocillo de electroforesis. Mediante esta técnica se han determinado en 1992 los mapas físicos y el tamaño del genoma de gran número de bacterias (Kieser *et al.*, 1992). Los tamaños del genoma de estas bacterias determinados por PGFE no siempre coinciden con los tamaños determinados mediante otras técnicas, tales como electromicroscopía, cuantificación de ADN, renaturalización, cálculo de distancia entre marcadores, etc.

La combinación de la PFGE y el corte del ADN genómico con enzimas de restricción raras que reconocen secuencias de 6 ó más bases (Lee & Smith, 1988) se utiliza frecuentemente en la identificación y clasificación de especies bacterianas, pequeños cromosomas de levaduras y otros eucariotas.

3.2.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un técnica para la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN por la extensión simultánea de ambas cadenas de ADN desde unos cebadores en dirección 5' a 3'. Se emplean dos cebadores, cada uno de ellos complementario a una de las cadenas de ADN que son desnaturalizadas por calor, y que flanquean la región de ADN que queremos amplificar.

Típicamente la reacción de PCR consta de 3 pasos:

- Desnaturalización de la doble cadena de ADN a altas temperaturas (92-98°C).
- Anillamiento de los cebadores al ADN molde (37-70°C).
- Extensión o síntesis de ADN a partir de los cebadores por la acción de la polimerasa (70-74°C).

Estos pasos repetidos automáticamente en un termociclador 25-35 veces consiguen amplificar la secuencia dada más de 10^6 veces, así conseguiríamos producir 0'1-1µgrs de una secuencia única de genoma humano a partir de 50 ngrs de ADN genómico. Para acabar se realiza un único paso de extensión final (5'-15' a 72°C) al objeto de completar las moléculas de doble cadena nacientes.

Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos cuya longitud suele variar entre 10 y 30 bases. Se utilizan a concentraciones entre 0'1-1µM, concentraciones más altas, no sólo encarecen inútilmente la reacción, sino que generan inespecificidades y posibles dimerizaciones de los cebadores.

Para el diseño de los cebadores habría que tener en cuenta que el contenido en G+C sea de alrededor del 40-60%, que carezcan de estructuras complementarias sobre todo en el extremo 3', y que no tengan tendencia a formar estructuras secundarias.

Teóricamente la hibridación del extremo 3' del cebador con el ADN molde sería suficiente para el éxito de la reacción.

El ADN molde debe estar intacto al menos en la secuencia que queremos amplificar. Antes de comenzar la reacción de PCR suele hacerse un paso inicial de desnaturalización durante unos 5 minutos a 93-95°C. La concentración del molde dependerá del tipo de secuencia que queramos amplificar, así, se suele utilizar 1-100ngrs para ADN de plásmidos y 0'05-1µgrs para ADN genómico de una sólo copia, si los genes son multicopia, la cantidad de ADN molde necesario aún sería menor.

La optimización de la temperatura de anillamiento es crítica cuando usamos como molde grandes fragmentos de ADN o ADN genómico total.

Temperaturas bajas provocarán hibridaciones inespecíficas cebador-molde, mientras que temperaturas próximas a la temperatura de fusión conducen a hibridaciones cebador-molde en zonas con una homología cercana al 100%, generando amplificaciones específicas. A veces, al objeto de aumentar la especificidad, es muy útil llevar a cabo la reacción de PCR con temperaturas de anillamiento y extensión próximas a 70°C, lo que también redundaría en un ahorro de tiempo.

Existen varias fórmulas empíricas para el cálculo de la temperatura óptima de anillamiento, una de ellas es la siguiente:

$$[2(A+T)+4(G+C)-5]^{\circ}\text{C}$$

En estudios ecológicos y de identificación de rizobios los métodos más usados son el perfil de fagos (Bromfield *et al.*, 1986), resistencia intrínseca a antibióticos (Josey *et al.*, 1979), perfil de proteínas y plásmidos y propiedades serológicas (Jenkins & Bottomley, 1985; Demezas & Bottomley, 1986; Brockman & Bezdicek, 1989; Somasegaran & Bohlool, 1990) que necesitan del aislamiento de la bacteria de los nódulos, e incluso en el caso de los métodos serológicos la producción de anticuerpos.

El PCR puede hacerse con cebadores específicos de cepas, especies o géneros (Pillai *et al.*, 1992) o con cebadores que generen su "huella dactilar" ("fingerprint") (Williams *et al.*, 1990; Versalovic *et al.*, 1991). La información que se obtiene a partir de "fingerprints" realizados con cebadores al azar (AP, "Arbitrary Primers" o RAPD, "Random Amplified Polymorphic DNA") es muchos más valiosa que la obtenida por análisis del perfil de plásmidos o por estudios de polimorfismos de isoenzimas, pero mucho menor que la obtenida por RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism", polimorfismo de largos fragmentos de restricción) (Schofield *et al.*, 1987; Young & Wexler, 1988; Kaijalainen & Lindström, 1989; Engvild *et al.*, 1990; Demezas *et al.*, 1991; Harrison *et al.*, 1992; Laguerre *et al.*, 1992, 1993a y b y 1994).

La utilización de pequeñas sondas oligonucleotídicas complementarias a regiones variables de ARN ribosómico 16S y 23S permite la detección de determinadas bacterias en el medio natural (Amann *et al.*, 1990). En el caso de *Rhizobium* nos encontramos con algunas limitaciones por el desconocimiento de las secuencias de ARN 23S

y el hecho de que los ARNs 16S conocidos están tan conservados que es imposible diseñar sondas específicas de cepa, a lo sumo de género y especie (Willems & Collins, 1993; Huber & Selenska-Pobell, 1994a). En 1994, Tichy & Simon identificaron y caracterizaron unas 50 bacterias, tanto gram-negativas como gram-positivas, de la rizosfera usando análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA-"Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis") mediante cebadores de las regiones conservadas de los ADNs ribosómicos 16S y utilizando enzimas de restricción que cortan en las regiones no conservadas de estos ADNs

Los cebadores correspondientes a secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP-"Repetitive Extragenic Palindromic elements") o secuencias consenso enterobacterianas intergénicas repetitivas (ERIC-"Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus") se utilizan para generar "fingerprints" de diferentes genomas bacterianos (Versalovic *et al.*, 1991). En 1992 De Bruijn ha utilizado estos cebadores para hacer el "fingerprint" de genomas de aislados de *R. meliloti* y otras bacterias del suelo, y en 1993 Judd *et al.*, los han utilizado para clasificar cepas de *B. japonicum* del serogrupo 123. Se ha demostrado también que los "fingerprints" de bacteroides y formas indiferenciadas son idénticos, tampoco varían los generados con ADN total, con células intactas, con cultivos viejos o frescos, ni con nódulos. Los "fingerprints" obtenidos se pueden usar para la identificación de rizobios en el suelo, en inóculos o en muestras de nódulos.

Los dendrogramas procedentes de REP-PCR y ERIC-PCR de distintas cepas de *R. galegae* coinciden con los dendrogramas generados por RFLP (Nick & Lindström, 1994; Selenska-Pobell *et al.*, 1995).

Mediante la creación de genotecas de sustracción es posible generar marcadores específicos de determinadas cepas que pueden ser liberadas frente a la microflora autóctona del suelo. Así, se han generado estas sondas específicas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y *R. tropici* (Streit *et al.*, 1993) que pueden ser detectadas por PCR.

3.3.-Distribución de secuencias de inserción ("IS-fingerprint")

Las secuencias de inserción (IS) se definen como entidades genéticas móviles relativamente pequeñas (entre 700 y 2500 pares de bases), y que a diferencia de los transposones que llevan resistencia a drogas o/y antibióticos, no contienen genes seleccionables. (Campbell *et al.*, 1977). Además de inserciones, estos elementos son capaces de provocar

inversiones, deleciones y fusiones de replicones que conduzcan a la activación y expresión de genes crípticos (Berg & Howe, 1989). Los primeros elementos IS en procariotas se identificaron como agentes causantes de mutaciones espontáneas en *E. coli* (Jordan *et al.*, 1968; Shapiro, 1969). Posteriormente se han descrito varios tipos de elementos transponibles como constituyentes naturales de cromosomas bacterianos, plásmidos y bacteriófagos. En el caso de las bacterias gram-negativas, la mayoría de los IS se han identificado en bacterias entéricas, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*.

Los elementos IS de procariotas se caracterizan por la presencia de secuencias repetidas e invertidas (IR), normalmente en los extremos, y la creación de duplicaciones directas en el sitio de integración (DR) (Iida *et al.*, 1983; Lewin, 1990).

El tamaño de las IR oscila entre 10 y 45 pb, y no tienen que ser exactamente idénticas. Una determinada IS presenta siempre las mismas IR que serán reconocidas por la transposasa. El tamaño de las DR generadas durante el proceso de transposición es constante para cada IS y varía entre 5 y 9 pb.

La transposición puede ser conservativa, cuando simplemente el elemento se mueve de un sitio a otro, o replicativa, cuando se genera una nueva copia. La frecuencia de transposición, aunque variable, oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} por elemento y por generación.

El tamaño de las IR que flanquean los elementos IS en *Rhizobium* es variable, siendo de 22, 30 y 41-42 pb, para *ISRM2*, *ISRM3* e *ISR1* respectivamente. En cuanto a las duplicaciones, *ISR1* origina duplicaciones de 4 pb, *ISRM1* de 5 pb e *ISRM2* e *ISRM3* de 8 ó 9 pb. El número de ORFs varía entre una identificada en *ISRM3* y cinco identificadas en *ISR1*.

Los elementos IS se agrupan dentro de grandes familias de características similares. Así, *ISRM3* de *R. meliloti* entra dentro de una clase de elementos de inserción que incluye IS256 de *Staphylococcus aureus* y IST2 de *Thiobacillus ferrooxidans*. (Wheatcroft & Laberge, 1991; Soto *et al.*, 1992a). *ISRM3* está ampliamente distribuido y conservado dentro de los *R. meliloti* aislados de diferentes localizaciones geográficas. Además este elemento da hibridaciones positivas con ADN procedente de cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. En *Rhizobium* los elementos IS presentan dos características especiales, en primer lugar, aparecen en una o muy

pocas especies, y en segundo lugar, cuando aparecen lo hacen preferentemente en los genes de nodulación (*nod*) y de fijación de nitrógeno (*nif*). Así, *ISRm1* queda restringido a *R. meliloti*, una cepa de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y dos aislados de alfalfa taxonómicamente intermedios (Wheatcroft & Watson, 1988). *ISRm2* (Dusha *et al.*, 1987) e *ISRm3* (Wheatcroft & Laberge, 1991) están distribuidos de forma similar aunque *ISRm3* se ha encontrado también en *R. leguminosarum*. *ISRm1* e *ISRm2* se identificaron como causantes de mutaciones en genes *nod* de *R. meliloti*, e *ISRm3* como un inactivador natural del gen *nodG* (Ogawa *et al.*, 1991). *ISR1* se detectó en *R. lupini* por crear una alta inestabilidad en plásmidos (Priefer *et al.*, 1989).

En 1995 Deng *et al.*, han sugerido que los elementos de inserción *IS1312* e *IS1313* de *A. tumefaciens* pueden ser el resultado de una transferencia génica horizontal de *ISRm1* e *ISRm2* de *R. meliloti*.

Simon *et al.*, en 1991 han utilizado un nuevo método para la determinación de elementos IS en bacterias gram-negativas mediante el uso de vectores de selección positiva en nuevos hospedadores de amplio espectro.

En nuestro laboratorio se ha determinado dentro de la cepa de *R. meliloti* GR4 la presencia de los genes *nfe* en el plásmido pRmeGR4b implicados en la eficiencia de nodulación y competitividad. La región *nfe* aparece rodeada de elementos IS: *ISRm3* a 128 pb de *nfeD* (Soto *et al.*, 1994) e *ISRm4* a 2500 pb (Soto *et al.*, 1992b). Solapando con *nfeA* aparece una ORF con homología con las transposasas (Soto *et al.*, 1993). A 4300 pb de *nfeD* se ha identificado un nuevo elemento IS llamado *ISRm6* como miembro de la familia IS3. (Zekrí & Toro, 1996). En las proximidades de *ISRm6*, a unos 1300 pb, se ha localizado otro nuevo elemento IS denominado *ISRm7* (Zekrí, comunicación personal).

El estudio de la distribución de distintos elementos de inserción en *Rhizobium* mediante hibridación ADN-ADN ha servido de base para la creación de los llamados "IS-fingerprints" como método de identificación de cepas y para el seguimiento de posibles transferencias génicas (Villadas *et al.*, 1995).

4.- La simbiosis *Rhizobium-leguminosa*

La capacidad de fijar nitrógeno aparece en muchos y muy diferentes grupos microbianos (Young, 1992), en vida libre o en simbiosis con plantas. En relación con la cantidad de N₂ fijado e

incorporado a la biosfera, es de gran importancia la simbiosis mutualista que se establece entre las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* con plantas leguminosas (Young & Johnston, 1989). Esta asociación contribuye con el 80% del nitrógeno fijado de forma estable, además, las plantas implicadas constituyen una importante fuente de alimentación animal y humana. Esta simbiosis se caracteriza por su gran especificidad, esto es, cada rizobio interacciona con una o muy pocas especies de plantas relacionadas.

Tras la infección de una leguminosa huésped, los rizobios inducen en la planta la formación de un nuevo órgano, el nódulo, donde tendrá lugar la fijación de nitrógeno que es llevada a cabo por una forma especializada de la bacteria denominada bacteroide. El amonio producido es entonces exportado a la célula hospedadora e incorporado al metabolismo de la planta.

El uso de inoculantes biológicos es una actividad común en la práctica agrícola moderna, sin embargo, su éxito se ve condicionado en gran medida por lo que se conoce como el problema de la **competitividad**, entendida como la capacidad del inóculo no sólo de ser eficiente a la hora de fijar N₂, sino también de competir con la flora autóctona, muy bien adaptada a su nicho ecológico, por la colonización de las raíces y la formación de nódulos fijadores. La obtención de cepas altamente eficientes no supone grandes problemas con los conocimientos actuales sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, sin embargo, la obtención a la vez de cepas eficientes y altamente competitivas supone aún en nuestros días un problema pendiente de solución (Triplett, 1990; Temprano *et al.*, 1991; Triplett & Sadowsky, 1992; Olivares *et al.*, 1993; Streeter, 1994).

La formación del nódulo es un proceso complejo que implica un reconocimiento específico entre micro y macrosimbionte; todo esto conlleva una serie de cambios en la expresión de distintos genes tanto en la bacteria como en la planta. En este reconocimiento se requiere la producción de flavonoides específicos de la planta que inducirán genes específicos de las bacterias implicados en la biosíntesis de moléculas-señal especiales (quitoolipooligosacáridos, LOS) que iniciarán el proceso de formación del nódulo (Lerouge *et al.*, 1990; Lugtenberg *et al.*, 1991; Spaink *et al.*, 1991a y b y 1992; Denarié & Roche, 1992; Hirsch, 1992; Price *et al.*, 1992; Sanjuan *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 1992; Van Brussel *et al.*, 1992). En el campo el proceso de nodulación también depende de factores medioambientales tales como el pH, presencia de aluminio,

manganeso, nitrato, deficiencias en elementos tan esenciales como el calcio o el fósforo, así como la temperatura.

En la competencia por la nodulación podemos distinguir dos fases, una primera etapa en la que las distintas cepas compiten por colonizar el suelo y la rizosfera, y que depende fundamentalmente de factores edáficos; y una segunda etapa en la que la competencia se centra en colonizar la raíz y formar nódulos, mucho más dependiente de las características propias del rizobio y la leguminosa.

El problema que plantea la competitividad de las cepas de *Rhizobium* puede abordarse de diversas formas, por un lado alterando el rango de hospedador de las cepas de *Rhizobium* y/o usando genotipos de leguminosas con infectividad restringida; construyendo cepas de *Rhizobium* altamente competitivas; realizando inoculaciones masivas repetidas veces durante varios años al objeto de conseguir la persistencia del inóculo en el suelo y facilitar, de esta manera, el posible desplazamiento de las cepas autóctonas; y finalmente realizando un control químico de la nodulación haciéndola, por ejemplo, independiente de la presencia de flavonoides a la vez que se utilizan inhibidores de la inducción de los genes *nod* en las cepas indígenas (Spaink *et al.*, 1989; Kosslak *et al.*, 1990; Cunningham *et al.*, 1991).

La inoculación con *Rhizobium* suele hacerse en suelos pobres o con baja población de rizobios, o bien en suelos cuyas poblaciones de rizobios establecidas sean ineficientes.

4.1.-Factores que afectan a la competitividad

Los rizobios en el suelo permanecerán como saprófitos con la posibilidad de utilizar como fuentes de carbono y energía una variedad de compuestos que van desde azúcares a fenoles. La presencia de la planta hospedadora en el suelo estimula la población de rizobios de la rizosfera. Los exudados radicales, además de ser un aporte de carbono y energía para las bacterias, contienen también sustancias con distinto poder quimioatractivo sobre las diversas especies microbianas que provocarán una selección de los microorganismos rizosféricos. En estas condiciones el inóculo ha de competir por el uso de nutrientes, no sólo con los rizobios nativos, sino también con el resto de flora bacteriana del suelo.

En cuanto a factores físicos del suelo, se sabe que suelos con pH neutro o ligeramente alcalino favorecen la nodulación, y que a medida que baja el pH muchas leguminosas se muestran incapaces de ser noduladas; su exudado de carbono desciende; se favorece la toxicidad por

aluminio, hierro y manganeso; bajan los niveles de fósforo, calcio, magnesio y molibdeno además de afectar negativamente al crecimiento de la leguminosa huésped. En general, los rizobios más sensibles al pH nodulan más lentamente que aquellos que toleran mayor acidez.

Estudios sobre nodulación de judías muestran que el pH del suelo podría condicionar qué simbiotipo de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* nodulará competitivamente *Phaseolus vulgaris* (Frey & Blum, 1995).

El tamaño de las partículas y poros del suelo condiciona el tamaño celular, así rizobios de menor tamaño pueden tener cierta ventaja ecológica al ocupar los poros más pequeños evitando las fluctuaciones del potencial hídrico y la predación.

Las cepas de *R. meliloti* ácido tolerantes requieren un mayor nivel de calcio para su crecimiento, *R. leguminosarum* bv. *viciae* necesita calcio para la síntesis de ricadhesina y el mantenimiento de la estabilidad de algunas proteínas de la membrana externa ligadas al peptidoglucano. Con bajos pHs la infección de los pelos radicales requiere una mayor cantidad de calcio que para el crecimiento de la leguminosa. En estas condiciones un suplemento de calcio incrementa la inducción de los genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Beck & Munns, 1985; Howieson & Ewing, 1986; Rechcigl *et al.*, 1987; Richardson *et al.*, 1988; Graham, 1992; Glenn & Dilworth, 1994).

La temperatura es un factor muy importante en la persistencia de *Rhizobium* en el suelo, su capacidad de competir y el mantenimiento de una tasa óptima de fijación de nitrógeno dentro del nódulo. En general, la temperatura óptima para la nodulación y fijación de nitrógeno está entre los 20 y 30°C, que es la temperatura en torno a la cual funciona el metabolismo de *Rhizobium*. Temperaturas elevadas afectan a la iniciación y desarrollo del nódulo o a la eficiencia de fijación, mientras que las bajas temperaturas reducen la formación de nódulos y la fijación. Los cambios de temperatura afectan a la capacidad competitiva de distintas cepas de *Rhizobium*. También existen combinaciones rizobio-leguminosa sensibles a la temperatura, este es el caso de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 que forma nódulos con *Trifolium subterraneum* cv. Woogenellup en el laboratorio a 25°C pero no a 22°C, a pesar de ser capaz de nodular otros cultivares a bajas temperaturas. En el campo, sin embargo, esta cepa no nodula el cultivar Woogenellup (Gibson, 1968; Lewis-Henderson & Djordjevic, 1991 a y b.).

Las condiciones de sequía, que habitualmente va acompañada de estrés salino, afectan a la supervivencia y competitividad de los rizobios

(Bottomley, 1992; Glenn & Dilworth, 1994; Bordelau & Prévost, 1994). Los niveles elevados de cloruro sódico alteran el metabolismo bacteriano a la vez que incrementan el contenido de glutamato intracelular para mantener el balance iónico célula-medio. La salinidad altera la fijación de nitrógeno y la síntesis de glutamina. En general, las leguminosas son más sensibles que los rizobios a las condiciones salinas.

Los herbicidas afectan a la competitividad de *Rhizobium* al influir en el crecimiento de las plantas. Por otra parte, se ha comprobado que semillas tratadas incluso con bajas concentraciones de fungicidas conducen a una pobre nodulación.

La microflora del suelo ejerce una gran influencia sobre la colonización de la rizosfera y la nodulación de las estirpes inoculadas. Así por ejemplo, la presencia de bacteriófagos o bacteriocinas alterará el tamaño de las poblaciones de la rizosfera, también parece influir la presencia de protozoos o asociaciones de micorrizas o del parásito intracelular *Bdellovibrio. Erwinia herbicola* puede suprimir la nodulación de los rizobios mediante la producción de una toxina o bloqueando los sitios de unión a los pelos radicales (Handelsman & Brill, 1985).

En cualquier caso, y por muy similares que sean las condiciones de laboratorio a las de campo, el éxito en la obtención de un buen inóculo en el laboratorio no garantiza el mismo comportamiento una vez liberado en el campo.

4.2.-Cepas rizobianas y leguminosas con su rango de huésped modificado

Hay determinados genes, antes denominados *hsn*, que determinan la especificidad de la bacteria por una planta determinada. Mutaciones en estos loci, que no pueden ser complementadas por regiones análogas de otras especies de rizobios, causan un retraso o una menor efectividad de nodulación y pueden alterar el rango de hospedador. Entre estos genes están los *nodFEGH* en *R. meliloti* y *nodFE* en *R. leguminosarum* y *R. trifolii*. Algunos de estos genes como *nodFE*, *nodL* y *nodM* están presentes en todas las especies de *Rhizobium*, mientras *nodO* se encuentra sólo en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *nodH* y *nodPQ* en *R. meliloti*, *nodZ* en *B. japonicum* y *nodSU* en *B. japonicum* USDA110, *Rhizobium* NGR234, *Azorhizobium caulinodans* y en *Sinorhizobium. fredii* USDA257.

Una forma de conseguir superar el problema de la baja ocupación de nódulos por la cepa inoculante en el campo consistiría en seleccionar genotipos de plantas con una nodulación limitada por las cepas nativas mientras que se favorecería la nodulación por la cepa inoculada. Se han encontrado varios genes de nodulación específicos de genotipo o cultivar (GSN o CSN) que permiten la nodulación de genotipos o cultivares específicos dentro de una misma especie de leguminosa. Estos genes pueden actuar tanto positiva como negativamente en cuanto al control de la especificidad de nodulación se refiere. Así, el gen *nolA* de la cepa de *B. japonicum* USDA110 parece codificar para una proteína reguladora transcripcional de unión al ADN homologa a MerR (Sadowsky *et al.*, 1991). Se ha sugerido que Nola ejerce un efecto represivo sobre la expresión inducida por isoflavonoides de los operones *nodD(1)* y *nodYABCSUIJ* (Dockendorff *et al.*, 1995).

El locus cromosómico *nolC* de *S. fredii* USDA257 influye en la especificidad por el cultivar de la cepa (Heron *et al.*, 1989; Krishnan & Pueppke, 1991). Este gen determina el que la cepa parental sólo nodule variedades primitivas de soja, como la Peking, pero no otras variedades comerciales más avanzadas, la inactivación de *nolC* causa una disminución en la producción de exopolisacáridos (Krishnan & Pueppke, 1992), y en la interacción con la variedad Peking, nódulos con anomalías estructurales y una menor capacidad para fijar nitrógeno. Este gen presenta una alta homología con el gen *dnaJ* de *E. coli* implicado en procesos de choque térmico; *nolC* podría ser un gen regulador ya que es capaz de modificar la cantidad de EPS producidos, así como de modular los niveles de nodulinas en la planta.

Otro gen determinante de la especificidad por cultivar es el *nodT* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* para la nodulación de *T. subterraneum* cv. Woogenellup (Lewis-Henderson & Djordjevic, 1991b).

Estudios recientes parecen indicar que la restricción de la nodulación por *B. japonicum* viene determinada por el genotipo de la raíz y depende de la temperatura de crecimiento de la planta. Los análisis microscópicos indican que esta restricción de la nodulación de la soja por *B. japonicum* ocurre tanto antes como después de la formación del primordio nodular (Sadowsky *et al.*, 1995).

Las cepas de *R. tropici* y *R. etli* muestran una capacidad limitada para nodular y fijar nitrógeno con *P. vulgaris* G21117 y G10002, pero son efectivos en simbiosis con los genotipos cultivados Jamapa y Amarillo Gigante. En experimentos de competición las cepas restringidas

competían con éxito con las cepas altamente eficientes CIAT632 alcanzando en Jamapa el 40% de nódulos (Montealegre & Kilpenot, 1994).

En 1995 Bromfield *et al.*, han encontrado que la distribución de genotipos de *R. meliloti* aislados del suelo difiere sensiblemente de la encontrada a partir de nódulos. *R. leguminosarum* bv. *viciae* es capaz de nodular *Pisum*, *Vicia*, *Lens* y *Lathyrus*, sin embargo, las plantas de guisante y de haba tienen distinta preferencia por determinadas cepas de *Rhizobium* de la población total. La competitividad para nodular guisantes se relaciona con la capacidad para catabolizar homoserina (Hynes & O'Connell, 1990).

Parece ser que los locus *nodM* y *csnI* controlan la nodulación del trébol subterráneo por *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU794. Este fenotipo es controlado por el gen recesivo de la planta *rwt-1*. La introducción de NodT o NodL en ANU794 permite la nodulación. El aumento en la proporción de quitolipooligosacáridos (LOS) con grupos acetilo afecta positivamente a la capacidad de nodulación lo que podría tener importantes implicaciones en la competición intercepas (Lewis-Henderson & Djordjevic, 1991; De Boer *et al.*, 1994; De Boer & Djordjevic, 1995).

Uno de los mejores ejemplos de la nodulación específica de genotipo nos lo da el caso de la cepa TOM de *R. leguminosarum* bv. *viciae* que es capaz de nodular el cultivar asiático de guisantes cv. Afghanistan (Brewin *et al.*, 1980). Las cepas europeas son incapaces de nodular este cultivar, sin embargo la cepa PF₂ es capaz de bloquear la nodulación de Afghanistan por la cepa TOM (Winarno & Lie, 1979). En la cepa PF₂ los genes *nodABC* y *nodFE* (Dowling *et al.*, 1989) están implicados en el fenotipo de bloqueo de la nodulación (Cnb), relacionado con la cantidad de factores Nod producidos. La cepa TOM forma relativamente poca cantidad de factores Nod lo que parece ser crucial para la nodulación de Afghanistan (Downie *et al.*, 1994). El gen *nodX* (Davis *et al.*, 1988), localizado en el plásmido simbiótico detrás de los genes *nodIJ*, parece ser el responsable de la capacidad de TOM para nodular Afghanistan, y es inducido por exudados de la raíz de guisante. Parece existir una interacción gen a gen en la que el gen *nodX* de la cepa TOM está controlado por un gen recesivo de la planta, *sym-2*. La cepa TOM presenta un perfil de LOS o factores Nod distinto al de las demás cepas de *R. leguminosarum* (López-Lara *et al.*, 1993; Firmin *et al.*, 1993).

4.3.-Genes y características de las bacterias implicados en competitividad

La capacidad de una cepa rizobiana para competir por la formación de nódulos puede verse alterada por cambios fenotípicos tales como la movilidad, la producción de polisacáridos o cualquier otra alteración del proceso simbiótico. Así, mutaciones en los genes *nod* comunes, los determinantes de la nodulación específicos de genotipo o cultivar (GSN o CSN), los *exo*, *lps*, *ndv*, *nif* pueden alterar la competitividad de la cepa bloqueando o retrasando la nodulación de la misma.

Además podemos encontrar otros genes rizobianos que sin estar directamente implicados en el proceso de nodulación, pueden condicionar la competitividad de las cepas. Algunos de estos genes tienen funciones conocidas, como es el caso de los de las rizopinas y bacteriocinas, y otros aún permanecen con una función desconocida, caso de los genes *nfe* (nodule formation efficiency).

4.3.1.-Bacteriocinas

Las bacteriocinas son unos antibióticos cuya producción da a la cepa productora una ventaja selectiva en la ocupación de nódulos. Así, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* T24, es una cepa inefectiva (Fix⁻) productora de la rizobiocina trifolitoxina (TFX) que permite a esta bacteria ser altamente competitiva cuando se coinocula con otras cepas sensibles (Schwinghamer & Belkengren, 1968; Triplet & Barta, 1987; Triplet *et al.*, 1988 y 1994; Triplet, 1990; Breil *et al.*, 1993). El gen *tfx* tras ser clonado y secuenciado se ha utilizado para transformar cepas sensibles como la TA1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* al objeto de obtener cepas productoras de trifolitoxina, y por tanto muy competitivas a la vez que eficientes. En cualquier caso todavía está en estudio la posible utilización de la trifolitoxina para aumentar la competitividad de los inóculos en liberaciones de campo.

4.3.2.-Superficie celular

En 1984 Handelsman *et al.*, encontraron cepas de *R. meliloti* con menor capacidad para ser aglutinadas por la aglutinina de alfalfa que eran más competitivas y en las que se inducía antes la formación de nódulos. Ya en 1989 Araujo & Handelsman aislaron mutantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* no mucoides menos competitivos; lo mismo ocurre con otros mutantes deficientes en exopolisacáridos (EPS) de *R.*

tropici y *B. japonicum* (Bhagwat *et al.*, 1991). En 1989 Zdor & Pueppke aislaron un mutante de *S. fredii* que producía menor cantidad de EPS y que era más competitivo para la nodulación del cultivar Peking. En el caso de *R. meliloti* desafortunadamente los mutantes EPS⁻ son a la vez Inf⁻ lo que impide realizar en ellos estudios de competitividad. Hay cepas de *B. japonicum* productoras de polisacáridos en grandes cantidades (NPS) que parece conferirles una alta competitividad en condiciones de campo (Streeter *et al.*, 1992)

4.3.3.-Motilidad.

La capacidad de movimiento permite a las bacterias orientarse acercándose hacia sustancias atrayentes y alejándose de las repelentes, haciéndolas más competitivas que las bacterias inmóviles. (Ames & Bergman, 1981; Mellor *et al.*, 1987)

4.3.4.-Velocidad de nodulación

Las cepas que consigan nodular más rápidamente serán más competitivas, ya que nodulan antes de que se dispare el mecanismo de autorregulación de la planta. (Dowling & Broughton, 1986; Sargent *et al.*, 1987; Hahn & Hennecke, 1988; Graham & McDermott, 1989)

4.3.5.-Rizopinas

Las rizopinas son compuestos sintetizados dentro del nódulo por los bacteroides y que son usados por cepas rizobianas de vida libre presentes en el canal de infección o en la rizosfera pero no por otras cepas más alejadas, confiriéndoles a aquellas una ventaja metabólica (Murphy & Saint, 1992). Los genes para su síntesis (*mos*) y su catabolismo (*moc*) se localizan en los plásmidos simbióticos. *mos* está regulado por el sistema NifA/NtrA. Se ha sugerido que el papel de las rizopinas consiste en proporcionar un sustrato selectivo para el crecimiento de determinados rizobios en la rizosfera y el canal de infección, de la misma forma que las rizopinas podrían impedir la infección por aquellas cepas incapaces de metabolizarla. En cualquier caso el concepto de rizopina abre diferentes posibilidades a la manipulación de inoculantes, haciendo posible el aumento de competitividad o incluso la persistencia de cepas beneficiosas en el suelo por transferencia de los genes de las rizopinas a estas bacterias o por selección de las cepas productoras de interés (Murphy *et al.*, 1995).

4.3.6.-Genes *nfe*

Los genes *nfe* se definen como genes implicados en la eficiencia de nodulación y competitividad que no se requieren en el proceso simbiótico (Sanjuan & Olivares, 1989). La eficiencia en la nodulación supone una nodulación más temprana y una mayor cantidad de nódulos (Toro & Olivares, 1986). La presencia de los genes *nfe* ocasiona mayor ocupación de nódulos en experimentos de competición entre cepas con una relación 1:1. Los genes *nfe* se encuentran en *R. meliloti* (Sanjuan & Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993) mientras *nfeC* se encuentra en *B. japonicum* (Chun & Stacey, 1994). La función de los genes *nfe* es hasta ahora desconocida, sólo NfeD muestra un 26% de identidad con la ornitina ciclodeaminasa (OCD) (Soto *et al.*, 1994) de *A. tumefaciens*, un enzima que transforma directamente ornitina en prolina con liberación de amonio; lo que podría sugerir una relación entre genes *nfe* y el metabolismo secundario y quizás un uso selectivo de determinadas fuentes de carbono disponibles durante el proceso de infección y que podrían ocasionar una mayor ocupación de nódulos.

4.3.7.-Prolina deshidrogenasa

En *B. japonicum* se ha sugerido que la actividad prolina deshidrogenasa (ProDH) podría jugar un importante papel en la fijación de nitrógeno (Kohl *et al.*, 1988, 1990, 1991 y 1994; Zhu *et al.*, 1992). Se ha encontrado actividad ornitina ciclodeaminasa (OCD) en *R. meliloti* (Soto *et al.*, 1994) y se ha determinado que el metabolismo de la ornitina en esta bacteria discurre vía prolina. Parece ser que la actividad ProDH se requiere para la eficiencia de nodulación y competitividad (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1995). La prolina o compuestos cuya degradación resultan en prolina deben ser una fuente de energía durante el proceso de infección.

4.4.-Colonización y supervivencia del inóculo

El número de rizobios aumenta durante el periodo de crecimiento de la planta por la liberación de bacterias procedentes de los nódulos en desintegración (Weaver *et al.*, 1972; Weaver & Frederick, 1972 y 1974; Barber, 1982; Kuykendall *et al.*, 1982; Hiltbold *et al.*, 1985; Brockwell *et al.*, 1987), en cualquier caso, sólo una pequeña parte de la población rizobiana total puede determinarse en el suelo por los métodos microbiológicos usados habitualmente (Kingsley & Bohlool, 1981), probablemente en parte por la adhesión de las bacterias a las partículas

del suelo (Ozawa & Yamaguchi, 1986). Durante el primer año en un cultivo de alfalfa, el movimiento lateral de *Rhizobium* no excede de los 20 centímetros. Los rizobios son unos buenos habitantes saprofíticos del suelo, además, algunas cepas de *B. japonicum* son también quimioautótrofas con capacidad para crecer en el suelo usando sólo H₂ y O₂ (Viteri & Schmidt, 1987 y 1989).

Distintos estudios coinciden en afirmar que una población de rizobios de 10⁵ bacterias/gramo de suelo, se dispersará en él y encontrará suficientes nutrientes orgánicos para sobrevivir siempre que las condiciones fisicoquímicas del mismo sean las adecuadas, aún en ausencia de la planta huésped. Un inóculo de *R. leguminosarum* en un suelo que ya contenía esta especie desciende de 10⁵-10⁶ a 10⁴ bacterias por gramo de suelo en tres o cuatro años (Jensen & Sorensen, 1987) y cae hasta 10² en suelos ácidos (Hiltbold *et al.*, 1985). *B. japonicum* se estabilizó en un suelo en el que no estaba presente antes de su liberación en unos niveles de >10⁴ por gramo de suelo (Croizat *et al.*, 1982).

El número de células de *Rhizobium* presentes en un suelo depende fundamentalmente del pH del mismo. Así, en suelos con pHs por debajo de 6, el número de *R. meliloti* apenas alcanza las 10 células/gramo; si el pH se sitúa entre 7-8 el número de células puede alcanzar hasta 10³ células por gramo de suelo (Amarger, 1980). *Bradyrhizobium* está ausente en suelos con pHs mayores de 6'5 y aparecen, sin embargo, aproximadamente 10² células por gramo de suelo con pHs entre 4'5 y 5'5. En general, las distintas especies rizobianas pueden alcanzar niveles de hasta 10⁷ células por gramo de suelo dependiendo del pH de éste.

La diversidad fenotípica existente entre aislados de la misma especie rizobiana procedente de distintos suelos es la base de la selección de cepas. Se han hecho estudios sobre la variabilidad en la efectividad de fijación de nitrógeno en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hagedorn, 1978; Mytton & Livesey, 1983; Schofield *et al.*, 1987), bv. *viciae* (Amarger, 1974) y *Bradyrhizobium* (Lagacherie *et al.*, 1976); variabilidad de serogrupos (Young, 1985); patrones de digestión de ADN; perfiles de plásmidos (Harrison *et al.*, 1988) y perfiles de proteínas.

La estabilidad de las cepas inoculadas es de al menos 10 años, aunque para periodos de tiempo más largos hay que considerar la posibilidad de que las transferencias genéticas aumenten la variabilidad e inestabilidad de estas cepas. Basándonos en el uso de sondas específicas de diferentes plásmidos Sym, parece ser que existe transferencia genética

entre las distintas poblaciones del suelo (Schofield *et al.*, 1987; Harrison *et al.*, 1988; Young & Wexler, 1988).

La liberación de rizobios en el ecosistema puede ocasionar problemas agonomicos como el establecimiento permanente de la cepa liberada en la microflora del suelo que luego podría entorpecer el éxito de posteriores liberaciones. Este problema se trata de resolver con la utilización de cepas incapaces de colonizar y persistir en el suelo de forma permanente, cepas manipuladas genéticamente de baja supervivencia, termosensibles o bien usando los llamados genes asesinos ("killing genes") por acumulación de toxinas (Cuskey, 1988).

5.-Transferencia de material genético en el ecosistema natural

Hay tres procesos naturales que suponen transferencia génica:

5.1.-Transformación

Es un mecanismo de transferencia génica horizontal que depende del funcionamiento de varios genes localizados en el cromosoma bacteriano (Hahn *et al.*, 1987; Dubnau, 1991) y que se expresan de forma coordinada como respuesta activa de las células a las condiciones medioambientales. Supone la toma, mantenimiento funcional y expresión de un ADN desnudo en el huésped. La adsorción de este ADN a partículas arcillosas y otras superficies lo protege de la degradación por nucleasas. Las bacterias son los únicos organismos capaces de sufrir el proceso de transformación de forma natural (Stewart, 1989). Hay numerosos datos que apoyan la idea de que efectivamente este proceso ocurre en el ecosistema de forma natural, como son el propio proceso de transformación en sí; la existencia de ADN extracelular en el medio y la capacidad de algunas bacterias para ingerir ADN y para adquirir un estado fisiológico de competencia en condiciones muy similares a las de su hábitat natural. Así la existencia de grandes cantidades de células protoplásticas como *Mycoplasma*, bacteroides de *Rhizobium* en nódulos,..., podría llevarnos a pensar en la transferencia de ADN de forma espontánea dentro de algunas comunidades bacterianas naturales, además de por la existencia de genes homólogos en muchas especies y de genes o partes de genes idénticos entre organismos no relacionados evolutivamente. En numerosísimos hábitats se han encontrado cantidades de ADN libre suficiente para que se den procesos de transformación (Leff *et al.*, 1992), así, el contenido de ADN del agua de ríos y lagos es de 1 a

300 ngrs/ml con un tiempo de recambio de unas 10 horas. En medios en los que la relación sólido:agua sea baja o en los que abunden las proteasas es difícil conseguir la competencia de microorganismos transformables de forma natural. La competencia puede adquirirse naturalmente por varias vías. Por adsorción a arcillas, como es el caso de estreptococos, o por crecimiento desbalanceado, como *Haemophilus*, que parece ser la forma natural más común de adquirir la capacidad de transformación sobre todo en el suelo. En muchos casos las bacterias son capaces de tomar tanto ADNs homólogos como heterólogos, sin embargo, *Haemophilus*, *Campylobacter* y *Neisseria* muestran preferencia por el ADN de su misma especie o de especies muy relacionadas (Mathis & Scocca, 1982). En el suelo inoculado con cepas de *Bacillus subtilis* se ha descrito transformación bacteriana (Mulder & Venema, 1982).

5.2.-Transducción

Supone la infección de una bacteria huésped activa, incorporación de los genes bacterianos a los viriones progenie, liberación de los viriones al medio donde podrían infectar otras bacterias receptoras, en definitiva, la introducción, establecimiento y extensión del ADN bacteriano transducido desde una bacteria donadora a otras bacterias receptoras del hábitat sensibles al mismo bacteriófago.

La supervivencia de los fagos aumenta con su adsorción a partículas (Stotzky, 1989), en vida libre pueden inactivarse y rápidamente sufren pérdida de infectividad. El ADN puede persistir en un virión fenotípicamente indetectable hasta llegar a infectar un huésped adecuado. Las bacterias lisogénicas parecen ser receptores efectivos en transducción (Kokjohn, 1989). Se espera que la inmunidad por superinfección aumente la probabilidad de éxito en el establecimiento de células transducidas en el ecosistema. Las condiciones medioambientales pueden inducir profagos de bacterias lisogénicas. El rango de huésped de los fagos depende de la existencia de receptores de superficie adecuados.

5.3.-Conjugación

Es la forma más importante de transferencia génica en la naturaleza, tanto intra como inter-especies. Algunos elementos conjugativos pueden transferirse a gran diversidad de géneros bacterianos e incluso a hongos y células vegetales o animales (Heinemann, 1991). La célula donadora debe tener un elemento conjugativo, ya sea plásmido o transposón, y se requiere un contacto físico lo suficientemente estable

entre las células donadora y receptora como para permitir la transferencia de material genético. Ambas células deben ser metabólicamente activas (Ippen-Ihler, 1989). Los plásmidos conjugativos pueden movilizar genes cromosómicos o de plásmidos no conjugativos. El rango de huésped de transferencia de los plásmidos conjugativos es incluso mayor que el de replicación, así se pueden liberar plásmidos no conjugativos y elementos transponibles en células en las que los plásmidos conjugativos no se pueden establecer. La conjugación, por tanto, es inespecífica y supone la expansión oportunista de genes. Se ha descrito transferencia conjugativa en lagos, ríos, suelos, superficie de plantas, seres humanos y animales.

Se ha detectado transferencia y recombinación de plásmidos simbióticos en el suelo, además de un aumento en la proporción de cepas nodulantes de *R. loti* por transferencia cromosómica de los genes simbióticos a cepas no simbióticas (Sullivan *et al.*, 1995).

Es de esperar que las frecuencias de transferencia detectadas en el ecosistema natural sean mucho menores que las medidas en el laboratorio en condiciones ideales. Sin embargo, los sucesos de recombinación pueden ocurrir más rápidamente en el medio natural que en el laboratorio ya que la expresión del gen *recA* se ve inducida por situaciones de estrés propias del medio (Miller & Kokjohn, 1990). La incompatibilidad entre los replicones introducido y residente también puede condicionar el establecimiento de un ADN dentro de las cepas receptoras, aunque esta barrera podría sortearse por recombinación entre los replicones implicados. Los sistemas de modificación (metilación)/restricción limitan a su vez la capacidad de transferencia y admisión de material genético, aunque estos sistemas pueden obviarse en situaciones estresantes como son la elevada temperatura, la luz ultravioleta,...

La transferencia horizontal en hábitats naturales puede ocurrir en diferentes huéspedes aunque de forma esporádica. La concentración de los componentes de un sistema de transferencia particular y la probabilidad de que tales componentes se encuentren en las condiciones adecuadas en el mismo ecosistema a la vez son fundamentales para que un suceso de transferencia pueda ocurrir. Sin embargo, las frecuencias a las que estos sucesos ocurren se encuentran por debajo o en los límites de detección que permiten las técnicas habituales, lo que en términos de seguridad medioambiental quiere decir que no estaría del todo claro el posible riesgo que se corre hasta no tener un conocimiento mucho más preciso de

cómo ocurre la transferencia génica en la naturaleza, cómo influyen las condiciones medioambientales y cuál es la frecuencia de transferencia en los distintos ecosistemas (Lorenz & Wackernagel, 1993).

6.-Sistemas contenedor

A pesar de los indudables beneficios que acarrea la liberación de microorganismos genéticamente modificados (MMG), su uso a gran escala es todavía muy restringido debido al desconocimiento del impacto ecológico que podría causar su liberación al ecosistema natural. Los microorganismos una vez liberados no sólo se multiplicarían, sino que serían objeto de la presión selectiva lo que podría alterar la conveniencia ecológica de su liberación al ignorar el destino último de estos microorganismos y de su material genético. Hasta la fecha no se ha detectado ningún problema medioambiental serio derivado de la liberación de MMGs (Hirsch, 1988; Kerr, 1989; Short *et al.*, 1990; Cook *et al.*, 1991; Drahos *et al.*, 1992; Lindow, 1992). Sin embargo, la mayoría de los experimentos se han hecho en sistemas controlados y no en campo abierto. En 1995 De Leij *et al.*, realizaron un experimento de liberación en campo en el que usando dos conjuntos de genes marcadores (*lacZY* y *Kan^R-xylE*) estudiaron la capacidad del inóculo para sobrevivir y dispersarse en el medio, las posibles transferencias de material genético con microorganismos relacionados y el impacto de la liberación sobre la población nativa. El resultado fue que la liberación de *P. fluorescens* SBW25 causó una perturbación significativa a la vez que transitoria de la composición de la comunidad microbiana cultivable de la fitosfera de trigo. Sin embargo, en términos de riesgo y daño podemos decir que el impacto fue menor, ya que el impacto causado tanto por la cepa nativa como por la modificada genéticamente fue similar, y en ambos casos escaso y transitorio, sin apreciarse ningún efecto sobre el crecimiento o salud de la planta.

La utilización de la ingeniería genética para potenciar determinadas rutas metabólicas que conduzcan a la eliminación de contaminantes del medio ambiente es el objetivo de una gran cantidad de grupos de investigación en todo el mundo. Sin embargo esta utilización requiere de un sistema contenedor que evite la transferencia de los genes manipulados a la población indígena y el posible daño a los ecosistemas naturales por el establecimiento de poblaciones bacterianas foráneas.

6.1.-Sistemas suicida

Para el control de los MMGs se han propuesto los llamados sistemas suicida, que no interfieren en el crecimiento normal del MMG pero que se expresan bajo determinadas condiciones fisicoquímicas del medio, limitando la supervivencia de la cepa liberada al entorno para el que se ha diseñado e impidiendo que escape de allí. En 1987 Molin *et al.*, describen un sistema suicida que permite al MMG sobrevivir sólo en presencia de triptófano (mantenimiento condicional). El sistema se basa en poner un gen con función asesina (*hok*) bajo el control del promotor del triptófano. En 1988 Bej *et al.*, describen otro sistema asesino por inducción del cassette *lac-hok* con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), aunque el sistema presentaba algunas limitaciones.

El gen *hok* del plásmido pR1 pertenece a una familia de genes que codifican para polipéptidos de menos de 52 aminoácidos cuya sobreexpresión colapsa el potencial de membrana y conduce a la muerte de la célula.

En 1991 Contreras *et al.*, describen un sistema suicida condicional para MMGs capaces de degradar benzoatos que consta de dos elementos. Un primer elemento formado por la fusión *ptac* y el gen asesino *gef* clonado en un miniTn5 que permitirá su integración cromosómica y un segundo elemento formado por las fusiones del promotor *pm* del plásmido TOL de *P. putida*, el gen *lacI* que codifica para el represor Lac y *xylS* que codifica para un regulador positivo de *pm*. Así, en presencia de efectores de XylS como el m-metilbenzoato, se sintetiza LacI y se impide la expresión de la función asesina. En ausencia del efector se expresa la función asesina y un gran porcentaje de células muere. La introducción de *P. putida* modificada genéticamente en microcosmos no tiene efectos significativos sobre la población nativa. Aparecen mutantes resistentes al fenotipo asesino con una frecuencia de 10^{-5} - 10^{-6} por célula y por generación ligados más a mutaciones en el elemento asesino que en el regulatorio.

Se necesita un gen asesino que codifique una función letal y un gen de inmunidad que codifique para un represor de esta función letal. El MMG llevará los genes letales y de nueva función íntimamente unidos, mientras que el gen de inmunidad estará tan separado que la cotransferencia de los genes letales y de inmunidad es altamente improbable. La transferencia de los genes letales y de nueva función solos ocasionará la muerte de la cepa receptora. En 1993 Díaz *et al.*, unen el gen asesino a rutas importantes en la mineralización de hidrocarburos

aromáticos, activándose en un rango tan amplio como posibles receptores haya, mientras que la función de inmunidad debe estar muy restringida de forma natural. El sistema colicina E3 (bacteriocina que inhibe la síntesis de proteínas por rotura del ARN 16S originando en 3' un fragmento de 50 nucleótidos) es un buen ejemplo. Los genes *colE3* e *immE3* localizados en el plásmido no autotransmisible pColE3-CA38 se cotranscriben en un único operón. A partir de aquí se han construido los plásmidos pUTKm-ImmE3, donde *immE3* está dentro de un minitransposon Tn5 bajo el control de los promotores de β -lactamasa y *ptac* que permiten la expresión constitutiva de *immE3* en *E. coli* y *P. putida* tras su integración en el cromosoma, y pEDF5 con el gen *colE3* bajo el control de *ptac*.

6.2.-Cepas atenuadas

Consiste en discapacitar los microorganismos (virus o bacterias) tanto con respecto a su patogenicidad como con respecto a su capacidad de proliferación o supervivencia en el medio en que vayan a ser liberados. Este es el caso del diseño de vacunas vivas en *Salmonella* y otras enterobacterias limitando su proliferación una vez que han entrado en el organismo diana. Esto se puede conseguir mutando los genes necesarios para la síntesis de aminoácidos aromáticos haciendo estas cepas dependientes del aporte exógeno de estos aminoácidos (Stocker, 1990) tan escasos en el tubo digestivo de los animales. Del mismo modo actuaría una mutación en el gen *crp*. Las bacterias únicamente serían capaces de crecer y sobrevivir en entornos fuera de los tubos digestivos de animales o de humanos ricos en aminoácidos aromáticos, donde no constituyen ningún riesgo. Otra estrategia similar es la utilización de cepas incapaces de sintetizar AMP_C o su proteína receptora (Curtiss, 1988)

Selbitschka *et al.*, en 1991 ya adelantaban que los mutantes *recA* de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* tienen disminuida su capacidad de recombinación homóloga y son más sensibles a los agentes que dañan el ADN y tienen un crecimiento más lento que las cepas salvajes, aunque no tenían afectada su capacidad simbiótica de fijación de nitrógeno. Ellos mismos construyeron mutantes bioluminiscentes *recA* de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* que llevan los genes *gusA* de *E. coli* y *luc* de luciérnaga y sugirieron una estrategia basada en la utilización de mutantes *recA* (Selbitschka *et al.*, 1992). En *E. coli* estos mutantes tienen disminuida su capacidad de recombinación homóloga (Smith, 1988), la reparación de su ADN y la inducción de las respuestas SOS (Walker, 1984). Parece ser que la proteína RecA juega un papel fundamental en la

respuesta de los microorganismos del suelo a los factores estresantes que dañan el ADN (Miller & Kokjohn, 1990).

6.3.-Vectores retrovirales

Los vectores retrovirales se utilizan como vehículos de transferencia génica en animales. Pero para hacerlos más seguros hay que impedir que estos retrovirus den lugar a progenie en las células diana. Esto se consigue haciéndolos defectivos en replicación, aunque mediante recombinación podrían aparecer virus competentes que podrían desencadenar respuestas patológicas en las células diana.

Areas de estudio para el diseño de vectores retrovirales seguros: mutagénesis dirigida al sitio de inicio de la retrotranscripción por un ARN_t específico del huésped; creación de integrasas deficientes; modificación del sitio de integración al objeto de modificar la transcripción y utilización de virus menos patógenos.

6.4.-Mutaciones en genes esenciales en situaciones de estrés

Vibrio S14 en situaciones de carencia de fuentes de carbono modifica notablemente su morfología y su metabolismo (Nyström *et al.*, 1990) apareciendo unos patrones de síntesis de macromoléculas totalmente distintos al de situaciones no estresantes. Mutaciones en los genes que se expresan en situaciones de hambre conducirán a un descenso en la viabilidad y la casi total eliminación de las cepas al cabo de 10-15 días en esas condiciones, siendo mutaciones totalmente silenciosas en condiciones normales. El fenotipo de supervivencia podría ser ideal para ser utilizado en el caso de liberaciones de microorganismos, ya que éstos tarde o temprano pasarán por situaciones de estrés una vez liberados, lo que limitará notablemente su supervivencia (Molin *et al.*, 1993).

OBJETIVOS DEL TRABAJO

La liberación de microorganismos modificados o no genéticamente en el suelo podría alterar sensiblemente la flora microbiana autóctona del mismo. De otro lado, las cepas liberadas podrían, a su vez, verse modificadas en una forma no deseada tras recibir información genética desde las poblaciones nativas del suelo.

Cualquier liberación de microorganismos al medio ambiente requiere un profundo conocimiento de la estructura y dinámica de las poblaciones autóctonas, así como del posible impacto que tales liberaciones pudieran causar.

En este trabajo se ha pretendido caracterizar diversas poblaciones autóctonas de *Rhizobium meliloti* en España, especialmente aquella del suelo de la Estación Experimental del Zaidín. Hemos querido también obtener información sobre el comportamiento de la cepa altamente competitiva, *R. meliloti* GR4 una vez liberada en el mismo suelo de donde se aisló hace unos veinte años así como del posible efecto sobre la población infectiva de alfalfa. Finalmente, hemos profundizado en el establecimiento de una metodología apropiada que nos permita detectar posibles transferencias de información genética desde las cepas nativas del suelo a las liberadas.

MATERIAL Y METODOS

1.-Cepas bacterianas y plásmidos

Las diferentes cepas de *Rhizobium* y *Escherichia coli* así como los plásmidos utilizados en el desarrollo de este trabajo se recogen en las **Tablas 2 y 3** respectivamente, junto con su procedencia y características más relevantes.

2.-Medios de cultivo y de conservación

2.1.-Medios para Rhizobiaceae

Para el crecimiento rutinario de *Rhizobium* se ha utilizado el medio TY (Beringer, 1974):

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0'5	g
Triptona (DIFCO)	5	g
Extracto de levadura (DIFCO)	3	g
Agua (desionizada)	1000	ml
Agar (PANREAC) (medio sólido)	15	g

Se esteriliza a 120°C durante 20 minutos.

TABLA 2. Bacterias utilizadas en este trabajo.

Bacteria	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Rhizobium meliloti</i>		
GR4b	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺ no mucoide	Casadesús & Olivares (1979)
GR4SS	Cepa derivada de GR4b; Nod ⁺ Fix ⁺ Sm ^r Sp ^r ; no mucoide	M.J. Soto
GRM6	Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4b	J. Mercado-Blanco
GRM8	Cepa derivada de GR4 curada de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b	J. Mercado-Blanco
GRM10	Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4a	J. Mercado-Blanco
RMGRAn	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en la EEZ (Granada)	Este trabajo
RMSAn	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Riego de la Vega (León)	E. Martínez-Molina
RMSn	Aislados de nódulos de <i>M. sphaerocarpa</i> en Riego de la Vega (León)	E. Martínez-Molina
RMAAn	Aislados de nódulos de <i>M. alba</i> en Riego de la Vega (León)	E. Martínez-Molina
SANn	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Naharros Nuevo (Salamanca)	E. Martínez-Molina
SAFn	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Florida de Liébana (Salamanca)	E. Martínez-Molina
SAPn	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Parada de Arriba (Salamanca)	E. Martínez-Molina
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>		
GRBn	Aislados de nódulos de <i>Pisum sativum</i> cv. Alaska Vicia en la EEZ (Granada)	Este trabajo
Bn	Cepas procedentes de Burgberg-Erlangen (Alemania)	W. Lotz
F3-n	Cepas procedentes de Schlüterhof-Munich (Alemania)	W. Lotz
BAn,SAn,SCn,SDn	Cepas procedentes de Dijon (Francia)	N. Amarger
T2	Cepa silvestre de Dijon Sm ^r Nm ^r mucoide	N. Amarger
FISn	Cepas procedentes de Rothamsted (Reino Unido)	P. Hirsch
<i>Sinorhizobium fredii</i>		
HH003	Cepa silvestre; Mel ⁺	Dowdle & Bohlool (1985)
HH102	Cepa silvestre; Sm ^r Gm ^r Mel ⁺	Dowdle & Bohlool (1985)
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>pro, leu, thi, lacY, endA, recA, mcrB, ara, galK, xyl, nutl, hsdR, hsdS, hsdM, Sm^r</i>	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)
DH5α	<i>recA1, endA1, φ80d, lacZ, dm15, hsdR17, supE44, gyrA, relA1</i>	Bethesda Research Laboratory

TABLA 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pUC18	Vector de clonaje y secuenciación, Ap ^r	Yanish-Perron <i>et al.</i> , (1985)
pRmNT40	pRK290 con 21 kb de pRmeGR4b, Tc ^r	Toro & Olivares (1986)
pSE22/pRSE22	pUC18 con el inserto <i>EcoRI</i> 22 de pRmNT40 en ambas orientaciones (contiene parte de <i>ISRm6</i>), Ap ^r	Este trabajo
pSE27/pRSE27	pUC18 con el inserto <i>EcoRI</i> 27 de pRmNT40 en ambas orientaciones. Ap ^r	J. Sanjuan
pSE27.1/PRSE27.1 pGEM-T	Clones de delección de los anteriores Vector de clonaje y secuenciación de productos de PCR, Ap ^r	M.J. Soto Promega

El medio mínimo utilizado para *Rhizobium* ha sido el de Robertsen *et al.*, (1981), modificado:

K ₂ HPO ₄	0'3	g
K ₂ HPO ₄	0'3	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0'15	g
CaCl ₂	0'05	g
FeCl ₃	0'006	g
NaCl	0'05	g
Glutamato sódico	1'1	g
Manitol	10	g
Biotina	0'0002g	
Pantotenato cálcico	0'0001g	
Agua (desionizada)	1000	ml
Agar purificado (BBL) (m. sólido)	17	g

El pH se ajusta a 6'8-7'0 y se esteriliza según las condiciones ya indicadas.

La temperatura de incubación para *Rhizobium* ha sido de 28°C.

2.2.-Medios para *E. coli*

Como medio de cultivo rutinario de las cepas de *E. coli* se ha utilizado el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989):

NaCl	5	g
Triptona (DIFCO)	10	g
Extracto de levadura	5	g
Agua (desionizada)	1000	ml
Agar (PANREAC) (m. sólido)	15	g

El medio se esteriliza igualmente a 120°C durante 20 minutos.

La temperatura de incubación para *E. coli* ha sido de 37°C.

2.3.-Medios de conservación

Para la conservación prolongada de cepas se utilizaron criotubos que contenían cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía con glicerol estéril hasta una concentración final del 20% de glicerol. Los criotubos se congelan rápidamente y se almacenan a una temperatura de -70°C, siendo viables durante varios años.

3.-Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada o agua-etanol al 50% dependiendo del tipo de antibiótico utilizado y esterilizadas a través de unidades de filtración Minisart^R NML (Sartorius) o bien FP030/3 (Schleicher & Schuell) ambas de 0'2 μm de tamaño de poro. Las concentraciones de trabajo fueron las siguientes (mg/l): Tetraciclina (Tc, SIGMA), 10; Kanamicina sulfato (Km, BOEHRINGER), 50 para *E. coli* y 180 para *Rhizobium*; Ampicilina (Ap, SIGMA), 200; Cloranfenicol (Cm, SIGMA), 50; Estreptomycina sulfato (Sm, CEPA), 50 para *E. coli* y 250 para *Rhizobium*; Espectinomicina (Sp, SIGMA), 100-250; Cicloheximida (CyH, SIGMA), 150; Gentamicina sulfato (Gm, SIGMA), 30; Neomicina (Nm, SIGMA), 100.

Para una mejor detección de *Rhizobium* en placas de petri cuando se siembran diluciones de suelo se ha utilizado la adición de Rojo Congo (RC, SIGMA) a una concentración de 25 mg/l.

4.-Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg & Cohen (1974).

Partiendo de un cultivo iniciador de la cepa de *E. coli* a transformar se inocula un matraz de medio LB y se incuba en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanza una DO₆₀₀ de 0'6. Tras dejar enfriar en hielo se centrifuga a 10.000 rpm (12.000xg) 5 min a 4°C. Las células se resuspenden en un volumen igual de MgCl₂ 0'1 M frío y se centrifugan a 5.000 rpm (3.000xg) 5 min a 4°C. A continuación se resuspenden en 1/2 volumen de una solución de CaCl₂ 0'1 M frío. Tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 min, las células se vuelven a centrifugar a 3.000xg 5 min a 4°C y se resuspenden suavemente en 1/10 volumen de CaCl₂ 0'1 M, 20% glicerol frío. Se reparten en alícuotas de 200 μl en tubos eppendorf estériles preenfriados y se conservan a -70°C. La competencia de las células se mantiene de esta forma durante varios meses.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez & Tait (1983) modificada. A

alícuotas de 200 µl de células competentes se le añade ADN (0'05-0'5 µg) y la mezcla se deja en hielo 30 min. Posteriormente se le somete a un choque de calor (5 min a 37°C). Se deja 5 min en hielo, y se le añade 1 ml de LB, incubándose a 37°C durante al menos 60 min. Transcurrido este tiempo se siembran alícuotas de hasta 0'2 ml en placas de LB con el correspondiente antibiótico.

5.-Ensayos con plantas

5.1.-Plantas

La planta usada en todos los ensayos de *Rhizobium meliloti* fue *Medicago sativa* L. (alfalfa), ecotipo Aragón.

Para los ensayos de *Sinorhizobium fredii* HH102 se usó la variedad Williams de *Glycine max* L. (Merr) (soja) y para los de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* se utilizó como huésped *Pisum sativum* cv. Alaska Vicia (guisante).

5.2.-Colecciones infectivas de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* de la EEZ

Se obtuvieron sembrando con alfalfa o guisante, según la colección de *Rhizobium* que se fuese a hacer, macetas de 500 grs que contenían una proporción 2:1 suelo:arena de sílice. Previamente la arena de sílice se lavó y se secó para ser posteriormente esterilizada y mezclada con suelo procedente de 9 muestras tomadas aleatoriamente dentro de nuestra zona de experimentación en la EEZ. Antes de la mezcla, el suelo había sido acibado a través de un cedazo al objeto de eliminar las partículas de mayor tamaño como piedras y restos vegetales.

Para realizar la colección de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se sembraron 16 macetas con dos semillas pregerminadas de la variedad Alaska Vicia de guisante cada una. A los 25 días, cuando prácticamente se había llegado ya a la floración, se aislaron unos 80 nódulos, cinco por maceta, que tras ser esterilizados (**ver apartado 5.7**), se trituraron y se sembraron sobre placas de TY para su posterior conservación en glicerol al 20%.

La metodología seguida para la realización de la colección de *R. meliloti* fue similar salvo que se sembraron 4 plantas de alfalfa pregerminadas sobre cada una de las 25 macetas utilizadas en este

experimento. A los 45 días se aislaron unos 8 nódulos por planta, algunos de ellos de hasta 0'6 cm de longitud. De todos ellos sólo los aislados de unos 200 nódulos se conservaron en glicerol, mientras que el resto de nódulos se congelaron ya esterilizados por si fuese necesario recurrir a ellos.

Todos los aislados que forman parte de nuestras colecciones de *Rhizobium* se recomprobó posteriormente para determinar si seguían conservando la capacidad de nodular sus respectivas plantas hospedadoras (alfalfa o guisante).

5.3.-Solución nutritiva

Para los cultivos hidropónicos de alfalfa se ha utilizado la solución libre de nitrógeno de Rigaud & Puppo (1975).

KH ₂ PO ₄	0'2	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0'2	g
KCl	0'2	g
CaSO ₄	0'12	g
EDTA FeNa ₂	0'025	g
Na ₂ MoO ₄	0'004	g
	Microelementos	
H ₃ BO ₃	0'018	g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0'020	g
ZnSO ₄	0'030	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0'002	g

El pH se ajusta a 7'5 y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos.

5.4.-Esterilización y germinación de semillas

Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2'5% de HgCl₂ durante 9 minutos y medio. Transcurrido este tiempo, se lavaron 5-6 veces con H₂O estéril y se dejaron en imbibición durante 2 horas. Posteriormente, se extendieron en condiciones asépticas sobre papel de filtro humedecido con H₂O colocado en placas de petri, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C durante 24-48 horas hasta conseguir su germinación.

La esterilización y germinación de otras semillas se ha hecho de forma similar a lo descrito para semillas de alfalfa.

5.5.-Cultivo axénico de plantas de alfalfa

Se ha seguido la técnica descrita por Olivares *et al.*, (1980). Cuando las plántulas de alfalfa han alcanzado 1-2 cm de longitud, se colocan en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm que contienen 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubren en su mitad inferior con papel opaco y, al cabo de tres días, se llevan a una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25°C/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

5.6.-Inoculación de las plantas

La inoculación de las plántulas de alfalfa se hizo tras una semana de permanencia en la cámara de cultivo, añadiendo a cada tubo 1 ml de la suspensión de suelo correspondiente .

La evaluación de las poblaciones infectivas de *R. meliloti* se determinó por la técnica del Número Más Probable (MPN), en la que 25 tubos con plantas de alfalfa crecidas en medio sin nitrógeno (**apartado 5.3**) se inoculan en diluciones seriadas de suspensiones de suelo y los resultados se valoran según las tablas correspondientes (Brockwell, 1982).

Los nódulos recogidos de los 25 tubos inoculados con las distintas diluciones seriadas de suelo inoculado se esterilizaron en superficie, se trituraron (**ver apartado 5.7**) y se ensayaron para la presencia de la cepa liberada *R. meliloti* GR4SS plaqueando los aislados en medio TY suplementado con estreptomycin y espectinomycin. Los aislados resistentes a estos antibióticos y de fenotipo no mucoide correspondían a la cepa liberada, como se confirmó posteriormente por análisis de PCR usando los cebadores específicos de GR4 (**ver apartado 10**). La presencia de la cepa liberada también se midió por plaqueo de diluciones seriadas de suelo sobre medio TY con los antibióticos selectivos Sm y Sp y con cicloheximida, para evitar la proliferación de hongos en las placas de petri. Las posibles colonias correspondientes a la cepa liberada también se confirmaron mediante técnicas de PCR. Ambos métodos de estimación de la cepa liberada, Número Más Probable y plaqueo directo nos dieron resultados similares.

5.7.-Reaislamiento de *Rhizobium* de los nódulos

Se tomaron los nódulos de la planta y se esterilizaron en superficie con HgCl_2 al 0'25% durante 5 min. Seguidamente se lavaron con agua estéril 5-6 veces y se trituraron individualmente o en las cantidades predeterminadas con anterioridad según los cebadores a utilizar (grupos de 5, 25 ó aproximadamente 200 nódulos según los casos), en condiciones asépticas, con una varilla de vidrio previamente flameada y enfriada al aire. Una gota del triturado se extendió sobre placas de medio TY con y sin los correspondientes antibióticos, y se incubaron a 28°C durante 3 ó 4 días.

5.8.-Medida de la competitividad para la nodulación de la cepa GR4SS

Para determinar el número de nódulos que una cepa de *R. meliloti* es capaz de formar en presencia de otra, las plantas de alfalfa en tubos se inocularon con suspensiones bacterianas formadas por la mezcla de las dos cepas, GR4 y GR4SS, en las proporciones 1:1 y 1:10. Estas cepas son diferenciables por la resistencia a los antibióticos estreptomomicina y espectinomomicina que posee GR4SS. Para la preparación de los inóculos se realizó el recuento del número de células viables de un cultivo en fase exponencial de cada una de las cepas en medio TY líquido. El resto se conserva en glicerol al 25% a -70°. Una vez realizados los recuentos y conocido el número de células viables, se tomó el volumen adecuado de cada uno de los cultivos almacenados y se diluyen en agua estéril para conseguir una concentración celular de 10^7 células por mililitro. Las dos suspensiones celulares se mezclan V:V en la relación 1:1 y 1:10 y la mezcla se utiliza para inocular (1 ml/tubo) un mínimo de 25 plantas (5 plantas/tubo). También se llevó a cabo un recuento del número de células viables de cada cepa en la muestra de inoculación, para comprobar que, efectivamente, estamos utilizando las proporciones calculadas.

Después de 14 días se reaislan las bacterias de al menos 25 nódulos de forma individualizada en medio TY con y sin los antibióticos correspondientes. En nuestro caso sólo una de las cepas está marcada con resistencia a antibióticos.

6.-Minipreparación de plásmidos

Para el aislamiento de plásmidos recombinantes se ha utilizado el procedimiento de lisis alcalina indicado en Sambrook *et al.*, (1989) a partir de Birnboim & Doly (1979) e Ish-Horowicz & Burke (1981).

Se partió normalmente de 1'5 ml de cultivo y después de recoger las células por centrifugación en tubos eppendorf, se resuspendieron en 100 μ l de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTANa₂ 10 mM). Se deja 5 min a temperatura ambiente, se añaden 200 μ l de la solución II (NaOH 0'2 M, SDS 1%), se agita invirtiendo el tubo y se deja 5 min en hielo. Posteriormente se adicionan 150 μ l de solución III (para 100 ml de solución: 60 ml acetato potásico 5 M -pH 4'8-, 11'5 ml de ácido acético glacial y 28'5 ml de agua) y después de agitar igualmente por inversión se deja otros 5 min en hielo. Se centrifuga a 15.000 rpm y al sobrenadante (400 μ l), se le añade un volumen igual de una solución de fenol-cloroformo (1:1) -siendo el cloroformo una mezcla de alcohol isoamílico:cloroformo 1:24. La mezcla de fenol contiene 100% fenol; 0'1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0'1 M pH 8. La mezcla se mantiene en agitación durante una noche y posteriormente se deja decantar-. Tras mezclar bien se separan las dos fases por centrifugación a 15.000 rpm 5 min, y el sobrenadante (fase acuosa) se transfiere a un nuevo tubo al que se añaden 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C. Se mezcla y se deja precipitando 15 min a -70°C. Se centrifuga 15 min a 15.000 rpm y el precipitado se lava con etanol al 70% y se vuelve a centrifugar durante 3 min. Por último se seca al vacío y se resuspende en 25 μ l de tampón TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

El ADN así obtenido puede usarse para diversas manipulaciones. En el caso de querer eliminar el ARN presente se puede tratar con ARNasa (1 μ l) de una solución concentrada (10 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM pH 7'5, NaCl 15 mM. (Esta solución concentrada se calienta a 100°C durante 15 min dejándose enfriar lentamente a temperatura ambiente y se almacena en alícuotas a -20°C).

Alternativamente al procedimiento detallado anteriormente, se procedió a la purificación de los ADNs usando el kit comercial de purificación "Magic Minipreps™" de PROMEGA, el cual tiene la ventaja de proporcionar material para secuenciar de una forma mucho más rápida (15 min). Se siguieron las indicaciones de la casa comercial: Se centrifugaron en un tubo eppendorf células procedentes de un cultivo de 3 ml. Después de una lisis alcalina llevada a cabo con las soluciones de

suspensión, lisis y neutralización (200 µl de cada una por tubo) que son aportadas por el kit, se centrifuga el lisado obtenido a 15.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se lleva a un nuevo tubo, al que se le añade 1 ml de resina de purificación y se mezcla bien. Esta mezcla se carga en una jeringa acoplada a una minicolumna por la que posteriormente se hacen pasar 2 ml de solución de lavado. Efectuado este paso, se les extrae todo el líquido a las columnas por centrifugación a 15.000 rpm durante 20 segundos en un tubo de microfuga. Finalmente el ADN plasmídico se eluye haciendo pasar por centrifugación durante otros 20 segundos 50 µl de agua o tampón TE8.

7.-Aislamiento de ADN total

De un cultivo bacteriano en fase logarítmica de la cepa elegida se toman 1'5 ml y se centrifugan durante 2 min en una microfuga. Las células se lavan con 0'5 ml de tampón TE8 adicionado de N-lauril sarcosina al 0'1%. Después se resuspenden las células en 1 ml de NaCl 1 M y la suspensión se deja al menos 1 hora a 4°C, agitando de vez en cuando. Se centrifuga durante 2 min, se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende hasta homogeneidad en 0'25 ml de sacarosa al 20% en TE. Después se adiciona 0'25 ml de TE con lisozima (5 mg/ml), se agita por inversión, incubándose durante 30 min a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionan 0'1 ml de TE con N-lauril sarcosina al 5% y pronasa predigerida 1 hora a 37°C (10 mg/ml) dejándose incubar una hora más a 37°C. Posteriormente, se adicionan 70 µl de acetato sódico 3 M, pH 5'2; 0'2 ml de mezcla fenol/cloroformo y 0'2 ml de mezcla de fenol (**apartado 6**). Se agita en vortex y se centrifuga durante 5 min recogiendo a continuación la fase superior acuosa. A esta última, se adiciona 0'3 ml de cloroformo, se agita de nuevo en vortex para centrifugar a continuación durante 5 min. La fase superior se recoge en un nuevo tubo y se le adiciona 0'7 ml de isopropanol enfriado a -20°C, se mezcla bien y se deja durante 15 min a -70°C. Después se centrifuga durante 15 min, el precipitado se lava con 0'5 ml de etanol al 70%, se seca al vacío y se resuspende en 50 µl de TE8.

8.-Determinación de las concentraciones de ADN y oligonucleótidos

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.*, (1989). Se mide la absorbancia de la solución de ADN o ARN en agua o en TE a 260 y 280 nm utilizando como blanco agua o TE sin ADN. La concentración en la muestra se calcula respecto a los valores estándar de DO_{260nm} , 1 para soluciones con 50 $\mu g/ml$ de ADN de cadena doble, 40 $\mu g/ml$ de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20 $\mu g/ml$ de oligonucleótidos. La relación DO_{260nm}/DO_{280nm} se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1'8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida (ver **Tabla 5**), también descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

9.-Preparación de lisados celulares

Las bacterias crecidas sobre placas de TY se recogen con palillos estériles y se resuspenden en 100 μl de 0'1% de N-lauril sarcosina (sarcosil) en TE8 ($DO_{600}=0'6$), se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 min y se lavan con agua desionizada esteril 1 ó 2 veces. El precipitado se resuspende finalmente en 100 μl de agua y se hierve 5-10 min. Se centrifuga y los lisados se conservan a 4°C.

10.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron sintetizados por Isogen Bioscience bv. (Amsterdam) o por el servicio de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Parasitología López Neyra, CSIC-Granada. Sus secuencias, origen, utilidad, tamaño de la amplificación y temperaturas de anillamiento para las distintas parejas de oligonucleótidos utilizadas en las reacciones de PCR se especifican en la **Tabla 4** y **Figura 1**.

TABLA 4: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Características	T _a anillamiento	pb amplificación	Referencia
R21: 5'-TTCTCGTATTTGATCGAACG-3' F9: 3'-AGAAATTAGCGCGCAAGTA-5'	Específicos del sitio de inserción de <i>ISRm4</i> en GR4 (Plásmido b)	55°C	275	Soto, M.J. (1993)
R43: 5'-GTCCAGGGCTATTTCTACGA-3' R44: 3'-AGTGTAGCGGGTGTAGGCG-5'	Específicos de <i>ISRm4</i>	65°C	563	Este trabajo
R31: 5'-TTCTGGACCAGCTCCTGGTT-3' R32: 3'-ATGCGTTGTTTCGGCAGATA-5'	Específicos de <i>ISRm3</i> en <i>R. meliloti</i>	56°C	530	Este trabajo
R35: 5'-TCCGAGGTTTTCGGCAAGGA-3' R32: 3'-ATGCGTTGTTTCGGCAGATA-5'	Específico de <i>ISRm3</i> . Util tanto en <i>R. meliloti</i> como en <i>R. leguminosarum</i>	65°C (1mM Mg ₂ Cl)	498	Este trabajo
P6: 5'-AGCCGCTGGTTCAGACGTAA-3' F2: 3'-AGACACGAGCTTCTATAGCT-5'	Específicos de genes <i>nfe</i> de pRmeGR4b	61°C	1.425	Soto, M.J. (1993)
C1: 5'-AATACCGAAATTCATCAGCG-3' C2: 3'-CCGTTGATATTCGCGATAGG-5'	Específicos del gen <i>repC</i> de pRmeGR4a	53°C	361	Este trabajo
ERIC2: 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'	Utilizado para la realización de "ERIC-Fingerprint"			De Bruijn, F.J. (1992)
RAPD5: 5'-GTTTCGCTCC-3'	Utilizado como "Ramdon Primer" para comprobar el funcionamiento de los lisados de <i>R. meliloti</i> del grupo 7	35°C		Isogen Bioscience bv.
R61: 5'-TGAAGCGCCGAAGAGGAGAA-3' R62: 3'-TATTGGTAAGGGCCGCGTG-5'	Específicos de <i>ISRm6</i>	55°C	860	Este trabajo
T7: 5'-GTAATACGACTCACTATAGG-3' SP6: 3'-ATATCACAGTGGATTTATCGA-5'	Utilizados para secuenciar fragmentos de ADN clonados en el vector pGEM-T			Promega
R41: 5'-AAGGACTTCCCGCCATTTTC-3' R42: 3'-AACAGCTCGCGTGTAAACGT-5' RL4: 5'-GAGGCTGACCGAAAAAG-3' SR4: 3'-GAAAAGCTCAGGCTGAG-5'	Utilizados para clonar y secuenciar fragmentos de elementos de inserción similares al <i>ISRm4</i> de <i>R. meliloti</i> en cepas de <i>R. leguminosarum</i> y <i>R. fredii</i>			Este trabajo

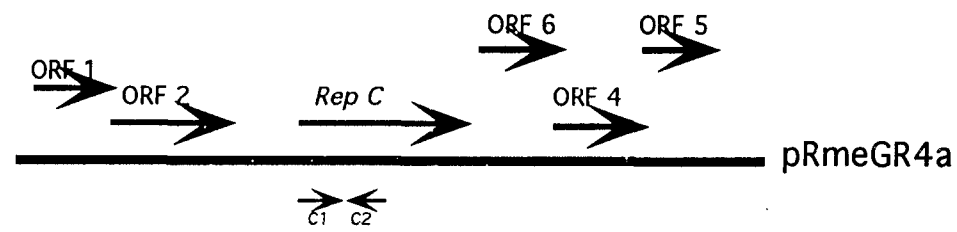
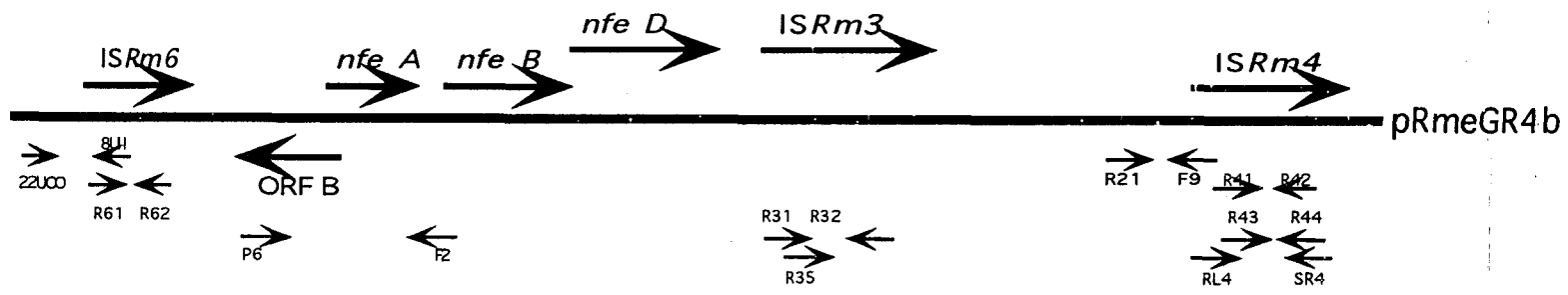


Figura 1: Esquema de la localización de los distintos cebadores utilizados procedentes de los plásmidos pRmeGR4b y a.

Todas las reacciones de PCR se hicieron con un patrón común de ciclos: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 6 minutos; 30 ciclos de síntesis divididos en tres pasos, paso de desnaturalización de 1 min a 95°C, paso de anillamiento durante 1 min a la temperatura específica de cada par de oligonucleótidos y paso de síntesis propiamente dicho de 1 min a 72°C; la reacción de PCR se termina con un último ciclo de terminación de cadenas a 65°C durante 15 min.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo en tubos para PCR de 0.5 ml GeneAmp de Perkin Elmer en termocicladores Linus refrigerados por agua. El volumen final de reacción fue de 25 µl cubiertos con unos 30 µl de aceite mineral (SIGMA) para evitar evaporaciones. Se amplificaron 4 µl de los lisados celulares ó 120 ngrs de ADN total purificado con 50 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos específicos; 0.4 mM de los deoxinucleósidos trifosfato y 2.5 µl de 10x tampón de PCR (BOEHRINGER) conteniendo 15 mM MgCl₂ (esta concentración, al igual que las temperaturas de anillamiento, se variaron ocasionalmente buscando mejorar las especificidades de la reacción cuando era necesario). En las reacciones se utilizó 1 unidad de Taq ADN polimerasa (BOEHRINGER).

11.-Manipulación enzimática de ADN

11.1.-Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN se ha llevado a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón recomendadas por los proveedores (BOEHRINGER y PROMEGA).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón. En caso contrario, y siempre que fuera factible, se digirió primero con la enzima que requiriese el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y la enzima para la segunda digestión. Cuando no fue posible, se llevó a cabo la digestión con una enzima, se fenolizó y se precipitó el ADN, resuspendiéndolo en el tampón adecuado para la segunda enzima y llevando a cabo la digestión con esta última.

Para comprobar el clonaje de fragmentos de PCR en el vector pGEM-T (ver apartado 11.3) efectuamos digestiones dobles *SacI/ApaI* con el

tampón A de digestión suministrado por BOEHRINGER a 33°C, que es la temperatura intermedia entre las óptimas establecidas para estas enzimas y a la que ambas funcionan bien.

11.2.-Purificación de fragmentos de PCR

La purificación de los fragmentos de ADN generados por PCR se llevó a cabo mediante el uso de "Magic PCR preps™" (PROMEGA) o "MicroSpin™ S300HR columns" (PHARMACIA).

En ambos casos se siguieron las instrucciones de las respectivas casas comerciales, si bien y dado que los resultados obtenidos fueron más rápidos y mejores con la utilización de las columnas de PHARMACIA, estas fueron las más utilizadas.

El protocolo de utilización de las columnas de PHARMACIA es el siguiente: se resuspende la resina de la columna por agitación. Se abre la tapa 1/4 de vuelta y se rompe la parte inferior de la columna. Dentro de un tubo eppendorf se centrifuga a 3.000 rpm durante 1 min. Tras haber eliminado el aceite mineral de la muestra de PCR con cloroformo, se coloca esta sobre la columna en un nuevo eppendorf y se centrifuga 2 min a 3.500 rpm para recoger así el producto puro de la amplificación que podrá entonces ser utilizado en otras manipulaciones.

11.3.-Ligación de fragmentos de restricción o productos de PCR

Las reacciones de ligación se efectuaron usando unas relaciones molares vector:inserto variables dependiendo del tamaño de los fragmentos, aunque relaciones molares de 1:8 y hasta de 8:1 funcionan perfectamente, sin embargo lo habitual es usar una relación molar 1:1. El cálculo de las relaciones molares vector:inserto se hace según la fórmula

$$\frac{\text{ngrs. vector} \times \text{kb de inserto}}{\text{kb de vector}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ngrs. inserto}$$

En todos los casos, el volumen final de la reacción fue de 20 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima T4 ADN ligasa (BOEHRINGER) y en el tampón suministrado por los proveedores, incubando 3-4 horas a temperatura ambiente o, alternativamente, durante una noche a 12°C.

12.-Electroforesis de ADN

12.1.-Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa

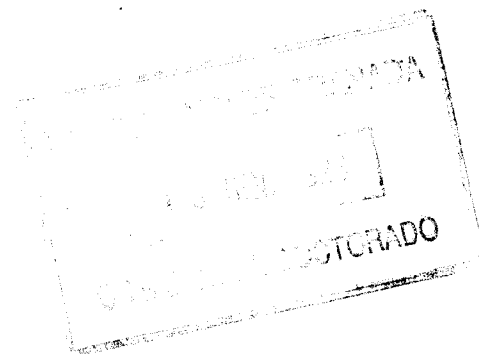
La separación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR se ha llevado a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa tipo I (SIGMA) al 0'7-1 % sumergidos en TBE (Tris 89 mM, EDTANa₂ 2'5 mM, BO₃H₂ 89 mM, pH 8'2). El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V. Como solución de carga se ha utilizado sacarosa 40% y azul de bromofenol 0'25% en una relación 5 μ l solución de ADN/1 μ l solución de carga.

Cuando el tamaño de los fragmentos es muy pequeño y las bandas de ADN que aparecen lo hacen de forma muy difusa o se pierden fácilmente, utilizamos una mezcla 3:1 de agarosa tipo I de SIGMA y NuSieve^R GTG^R agarosa (FMC BioProducts), hasta una concentración de agarosa total para el gel del 3% con la que se obtiene una mejor resolución de las bandas.

12.2.-Revelado de geles y fotografía

Los geles de agarosa se revelan sumergiéndolos durante 15-20 min en agua a la que previamente se añaden unas gotas de solución de bromuro de etidio (1 mg/ml). Posteriormente se observa con un transiluminador de luz UV de 260 nm.

Las fotografías de los geles se han realizado con una cámara POLAROID MP-4 y película POLAROID tipo 667, siempre con filtro rojo o con gelprinter VM5092 de TDI.



12.3.-Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa

La determinación del tamaño de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa (distancia de migración dividida por la longitud del gel), utilizando como patrones los marcadores de peso molecular de tipo II (fragmentos de ADN de fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasa *HindIII*), tipo III (fragmentos de ADN de fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*), tipo VI (fragmentos de ADN del plásmido pBR328 resultantes de la digestión con endonucleasas *BglII* y *HinfI*) y tipo VIII (mezcla de fragmentos de ADN resultantes de la digestión del plásmido pUCBM21 con endonucleasas *DraI* y *HindIII* y fragmentos resultantes de la digestión de este mismo plásmido con la endonucleasa *HpaII*) de BOEHRINGER y el marcador de peso molecular pGEM de PROMEGA (Tabla 5). Algunos de estos marcadores de peso molecular se utilizaron marcados con digoxigenina para el caso de usarse en geles que se vayan a transferir a filtros para posteriormente hibridarlos con sondas no radiactivas.

13.-Experimentos de hibridación ADN-ADN

13.1.-Transferencia de ADN a filtros de nylon

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN plasmídico o total a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975).

Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa. Una vez fotografiado el gel y tratado durante 10-15 min con luz ultravioleta se procede a su transferencia a un filtro de nylon (BOEHRINGER) previamente humedecido en H₂O destilada y 20x SSC (NaCl 3 M, citrato sódico 0'3 M, pH 7) haciendo uso del aparato de transferencia a vacío VacuGeneXL (Pharmacia Biotech.) con NaOH 1 M durante 1 hora.

Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lava en una solución de 2x SSC para eliminar restos de agarosa, se seca a temperatura ambiente y se cuece al vacío durante 20 min a 120°C.

TABLA 5: Marcadores de peso molecular de fragmentos de ADN. En los marcadores II y III se especifica la cantidad aproximada de ADN que correspondería a cada banda habiendo cargado en el pocillo 300 ngrs de marcador.

λ <i>Hind</i> III (M II) (pb)	M II (ngrs)	λ <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III (M III) (pb)	M III (ngrs)	pBR328 <i>Bgl</i> I y <i>Hinf</i> I (M VI) (pb)	pUCBM21 <i>Hpa</i> II y <i>Dra</i> I/ <i>Hind</i> III (M VIII) (pb)	pGEM (pb)
23.130	142'8	21.227	131'3	2.176	1.114	2.645
9.416	59'2	5.148	31'9	1.766	900	1.605
6.557	41'4	4.973	30'7	1.230	692	1.198
4.361	26'6	4.268	26'5	1.033	501	676
2.322	14'1	3.530	21'8	653	489	517
2.027	12'6	2.027	12'6	517	404	460
564	3'6	1.904	11'7	453	320	396
125	0'7	1.584	9'8	394	242	350
		1.375	8'2	298	190	222
		974	6'1	234	147	179
		831	5'1	220	124	126
		564	3'6	154	110	75
		125	0'7		67	65
					37	51
					34	36
					26	
					19	

13.2.-Marcaje de sondas de ADN para hibridación

Para marcar sondas no radiactivas con digoxigenina se hicieron reacciones de PCR especiales (**apartado 10**) en las que la única variación introducida fue la utilización de mezclas de nucleósidos trifosfato 10x (2 mM de cada uno excepto de dTTP que fue de 1'9 mM y 0'1 mM de dUTP marcado con digoxigenina).

Los fragmentos de ADN así sintetizados fueron usados como sonda tras ser purificados en las columnas de PHARMACIA o usando el kit Magic PCR PrepsTM de PROMEGA (**apartado 11.2**).

Las soluciones de hibridación que contienen las sondas utilizadas en el apartado siguiente pueden almacenarse a -20°C y ser reutilizadas varias veces. Antes de cada reutilización debemos redesnaturalizar la sonda por calentamiento de la solución de hibridación durante 10 minutos a 95°C y colocarla seguidamente en hielo durante unos minutos.

13.3.-Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas

El filtro de nylon se incubó en una solución de prehibridación (20 ml/100 cm²) compuesta de 5x SSC; N-lauril sarcosina 0'1%; SDS 0'02%; formamida 50% y agente bloqueante al 2% a 42°C durante al menos 1 hora. Esta solución se sustituye por la solución de hibridación (2'5 ml/100 cm²), de la misma composición a la que se le ha añadido unos 10 ngrs del ADN sonda desnaturalizado a 95°C durante 10 min y enfriado en hielo, y se incubó a 42°C un mínimo de 6 horas, habitualmente la incubación se realiza durante toda la noche.

Terminada la hibridación se lavan los filtros 2 veces a temperatura ambiente con 2x SSC; SDS 0'1% (50 ml/100 cm²) y otras dos veces durante 15 minutos a 50-68°C (dependiendo de la especificidad de la sonda) con 0'1x SSC; SDS 0'1%. Llegado este punto podemos iniciar el revelado o guardar los filtros hibridados tras secarlos al aire para su posterior detección.

La detección no radiactiva de las bandas de hibridación se efectuó usando el protocolo de detección quimioluminiscente tal y como indican los proveedores (BOEHRINGER) mediante el uso de fragmentos Fab de anticuerpos antidigoxigenina conjugados con la fosfatasa alcalina que desfosforilará el sustrato quimioluminiscente AMPPD^R. La impronta de las señales se realizó sobre películas Kodak X-OMAT. Las bandas de

hibridación aparecen en un intervalo de tiempo de entre 5 minutos y 3 horas.

Para el revelado de las películas se usó revelador Neutol Liquid NE (AGFA) y fijador N FIX 172 (NEGRA) a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

13.4.-"IS-fingerprint"

El ADN aislado según el protocolo del apartado 7 fue digerido con la endonucleasa *SalI* o *EcoRI* (apartado 11) según los casos, separado en geles del 0'8% de agarosa (apartado 12) y transferido a filtros de nylon (apartado 13.1). Estos filtros se hibridaron con distintas sondas para elementos IS marcadas con digoxigenina. Las sondas utilizadas para la realización del "IS-fingerprint" fueron *ISRm3* (fragmento *EcoRI*27 de 1'27 pb- Soto *et al.*, 1992a) e *ISRm4* (fragmento interno *MluI/SphI* de *ISRm4*-Soto *et al.*, 1992b), suministradas por la doctora M.J. Soto, con un sitio de restricción interno *SalI*; e *ISRm2011-1*, *ISRm2011-2*, *ISRm220-12-3*, *ISRmUSDA1024-1*, *ISRm102F34-1*, *ISRmMVII-10* suministradas por el doctor R. Simon y cuyas hibridaciones se llevaron a cabo en condiciones de alta estringencia (68°C y 5x SSC) en el laboratorio del Dr. Alfred Pühler en la Universidad de Bielefeld, Alemania.

13.5.-"ERIC-fingerprint"

Las reacciones de PCR y el análisis de los patrones de amplificación generados por estas en distintas cepas de *R. meliloti* de la EEZ con la utilización del cebador ERIC-2 se hicieron en el laboratorio del Dr. Alfred Pühler en la Universidad de Bielefeld.

Para las reacciones de "ERIC-PCR" las células se crecieron en placas de TY y se resuspendieron en 100 µl de 50 mM de NaOH, 0'25% de SDS. Se hirvieron durante 5 minutos y posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos. El lisado puede guardarse a 4°C.

14.-Secuenciación de ADN de cadena doble

14.1.-Preparación y marcaje del ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), siguiendo

básicamente la técnica descrita por Hattori & Sakai (1986) para la secuenciación de plásmidos, y utilizando la versión 2.0 del kit comercial Sequenase^R (United State Biochemical, USB) basado en una ADN polimerasa del bacteriófago T7 manipulada, según describen Tabor & Richardson (1987).

El ADN plasmídico obtenido según el procedimiento detallado en el apartado 6, se somete a una desnaturalización alcalina. A 18 µl de solución de ADN (2 µg) se le añaden 2 µl de NaOH 2 N y después de mezclar se deja a temperatura ambiente 5 min. Posteriormente se añaden 2 µl de acetato amónico 2 M pH 4'5 y se precipita con 66 µl de etanol 100% a -70°C durante al menos 10 min. Se centrifuga 15 min y el precipitado se lava con etanol 70%, se centrifuga y se seca al vacío. El ADN así desnaturalizado y seco puede conservarse a 4°C durante una semana.

Para la reacción de unión al cebador se procedió de la siguiente manera: al ADN desnaturalizado y seco se le añadieron 2 µl de tampón de secuenciación 5x, 1 µl de cebador (se usaron según las necesidades los cebadores procedentes de los promotores SP6 y T7 del vector pGEM-T o bien oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de secuencias conocidas). Finalmente se añaden 7 µl de agua bidestilada para completar un volumen de 10 µl. La reacción se llevó a cabo mediante incubación a 65°C durante 2 minutos, para dejar luego enfriar lentamente por debajo de los 35°C.

El marcaje se efectuó añadiendo a la mezcla anterior 1 µl de DTT, 2 µl de mezcla de marcaje diluída (dGTP, dCTP, dTTP, 0'75 µM), 0'5 µl de ³⁵S-dATP (5 µCi, >1.000 Ci/mmol) (AMERSHAM) y 2 µl de enzima diluída en tampón de dilución que consistía en una mezcla de Sequenasa y pirofosfatasa. La mezcla se incubó a 20°C durante 5 min.

La reacción de terminación se llevó a cabo distribuyendo alícuotas de 3'5 µl de las reacciones de marcaje a 4 tubos precalentados a 37°C que contenían 2'5 µl de cada una de las mezclas de terminación (A, C, G y T), continuando la incubación durante 5 min a 37°C. Por último, las reacciones se pararon adicionando 4 µl de solución de parada (formamida 95%, azul de bromofenol 0'1%, xilencianol 0'1%).

Todas las enzimas y tampones fueron aportadas por el kit de USB y las distintas mezclas y reacciones se efectuaron según las indicaciones del mismo.

14.2.-Resolución de compresiones

Para los casos en donde aparecieron zonas confusas o "comprimidas" debidas a la conformación secundaria del ADN, se usó una modificación al método general consistente en la sustitución de las mezclas de marcaje y de terminación con dGTP por otras que contienen dTTP. A su vez se realizó la modificación indicada por Stupi & Brummet (1991), basada en la introducción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Fawcett & Barlett, 1991). En este caso se procedió tal y como se indica en el apartado 14.1, efectuando las reacciones con mezclas dTTP, y antes de añadir la solución de parada, se adicionó a cada tubo de terminación 1 µl de una dilución de TdT (1 µl de cada dNTP 100 mM en 96 µl de tampón de dilución con 2 U/µl de TdT). Se mezcla e incuba durante 30 min a 37°C y posteriormente se paran las reacciones con la adición de 4 µl de solución de parada.

14.3.-Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los geles fueron preparados sobre placas Sequi-gen (BIORAD), de 21x40 cm o 38x52'5 cm muy bien lavadas y sin restos de jabón. Una de las placas del sistema fue tratada, cada 3-4 veces de uso, con dimetildiclorosilano (SIGMA) o con PLOT concentrate^R (SERVA) diluido en acetona, con objeto de formar una capa hidrófoba que evitase la adhesión del gel, y facilitase el arrastrado hacia la otra placa y la posterior manipulación del gel. Una vez preparado el dispositivo según las instrucciones de la casa comercial y usando separadores de 0'4 mm, se carga la solución de acrilamida para formar un gel del 6%-urea 7 M en tampón TBE. Para la formación de los geles grandes se prepararon volúmenes de 140 ml cuya composición fue: urea 58'9 gr, tampón 10x TBE 14 ml, acrilamida 30% -acrilamida:bis-acrilamida (BOEHRINGER) 28'5:1'5 en agua y filtrada a través de unidades tipo SCN de NALGENE- 28 ml y agua hasta completar los 140 ml. Para los geles pequeños se preparó la mitad del volumen señalado para geles grandes.

Para la preparación del margen inferior del gel se utilizaron 30 ml de la solución antes indicada adicionando los siguientes catalizadores: 210 µl persulfato de amonio (BOEHRINGER) al 25% en agua bidestilada y 150 µl de TEMED (SIGMA), y vertiendola sobre una almohadilla de papel Whatman 3MM depositada sobre la bandeja de fijación, donde se coloca firmemente encajado el dispositivo que contendrá el gel.

El gel se prepara con el resto de la solución a la que se añaden 100 µl de persulfato de amonio y 100 µl de TEMED, vertiéndose esta solución entre las dos placas de vidrio con cuidado de que no se formen burbujas. El borde superior del gel se define introduciendo los peines de diente de tiburón por su lado plano y se sella la parte superior del sistema con celofán.

Las muestras se cargaron entre los espacios definidos por dos dientes consecutivos, en un volumen de 3 µl, una vez que han sido desnaturalizadas durante 3 min a 95°C. La electroforesis, a 1.700 V (gel pequeño) y a 1.900 V (gel grande) en tampón TBE, se efectuó sobre geles precalentados a 50°C el tiempo necesario para permitir la lectura del número de bases que queramos, para lo cual a veces es necesario efectuar varias carreras en un mismo gel con el fin de abarcar un rango más amplio de lectura. La migración de los colorantes que componen el tampón de carga es determinante para el cálculo del tiempo de electroforesis, así, en un gel de poliacrilamida al 6%, el azul de bromofenol migra a la altura que lo haría un oligonucleótido de unas 26 bases, mientras que el xilencianol lo hace a la altura de oligonucleótidos de 106 bases (**Tabla 6**).

14.4.-Tratamiento y exposición del gel

Terminada la electroforesis y después de dejar enfriar un poco, se lava el gel con una solución H₂O:metanol:ácido acético (80:15:5) durante varios minutos (paso opcional), y se transfiere a un papel Whatman 3MM. Después de cubrirlo con papel celofán se seca al vacío a 80°C durante 1 hora. Una vez seco se expone a temperatura ambiente sobre película de autorradiografía (Hyperfilm™ β-Max (AMERSHAM) entre dos días y una semana.

Para el revelado de las películas se procedió como se indica en el apartado 13.3.

14.5.-Secuenciación automática

En algunos casos los fragmentos de amplificación por PCR clonados en el vector pGEM-T se han secuenciado automáticamente por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC-Granada) una vez puesto a punto el secuenciador automático laser de fluorescencia de Applied Biosystems.

TABLA 6. Tamaño (bases) de los oligonucleótidos comigrantes con los colorantes en geles de poliacrilamida.

Poliacrilamida (%)	Azul de bromofenol (bases)	Xiléncianol (bases)
5	35	130
6	26	106
8	19	75
10	12	55

Para llevar a cabo la secuenciación automática se utilizan 3'2 pmoles de cebador en un volumen final de 12µl. La cantidad de ADN a secuenciar es de 250 a 500 ngrs de ADN de doble cadena. Si utilizamos ADN de cadena simple las cantidades son de 50 a 100 ngrs, y con productos de amplificación de ADN no clonados en un vector plasmídico hemos de utilizar de 30 a 90 ngrs. La secuenciación se realiza mediante reacciones especiales de PCR a temperaturas que varían entre los 40 y 45°C dependiendo del oligonucleótido utilizado como cebador en las reacciones de secuenciación.

15.-Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

Los análisis previos de las secuencias de ADN obtenidas, búsqueda de sitios de restricción y localización de posibles ORFs se hicieron con las versiones 3.0 y 4.0 del programa GENEPRO (Riverside Scientific, Washington, Seattle, U.S.A).

Por otra parte, se utilizaron determinados programas del paquete GCG (Genetics Computer Group, Madison Wisconsin). Así se usaron los programas FASTA (Pearson & Lipman, 1988) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para la búsqueda de homologías en las secuencias de ADN y proteínas; BESTFIT (Smith & Waterman, 1981), que encuentra el mejor alineamiento entre dos secuencias con homología; PILEUP, que produce alineamientos de diversas secuencias; MOTIFS, que busca la presencia de determinados motivos del diccionario PROSITE presentes en una secuencia de proteína; REPEAT y STEMLOOP, que localizan la presencia de repeticiones directas o invertidas respectivamente en una secuencia y PEPTIDESTRUCTURE, que estudia la estructura de secuencias polipeptídicas desde diversos aspectos. Los bancos de datos consultados fueron GenEMBL, SWISSPROT y PIR.

En el diseño de oligonucleótidos se ha utilizado el programa OLIGOTM versión 4.0 (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN).

Para la comparación de determinadas secuencias de ADN y aminoácidos se utilizó la versión 2.3 del programa GENWORKS (Intelligenetics Inc.).

La comparación de los ERIC-PCR y los dendrogramas correspondientes se hicieron con el programa WinCam 2.0 (Cybertech) usando el método combinado de Dice & Pearson para todas las bandas de

200 a 1.200 pares de bases. En los cálculos de los dendrogramas se utilizó el método UPGMA ("Unweighted Pair Group with Mathematical Averaging").

16.-Análisis estadístico

El programa informático utilizado para los análisis estadísticos realizados durante el desarrollo de este trabajo fue el STATVIEW (Abacus Concepts, Inc.).

17.-Ensayos de campo

Para determinar el posible impacto de la liberación de una cepa nativa de *Rhizobium meliloti* sobre la población del suelo de la Estación Experimental del Zaidín, en marzo de 1993 liberamos la cepa GR4SS y seguimos su evolución y su posible influencia sobre la población nativa de *Rhizobium meliloti*.

Al objeto de determinar posibles transferencias de material genético desde la población nativa del suelo a una cepa liberada, liberamos la cepa foránea *S fredii* HH102 sobre semillas de soja.

17.1.-Preparación de *R. meliloti* GR4SS y semillas de alfalfa para la liberación

Las cepa a liberar, *R. meliloti* GR4SS, se crece en 100 ml del medio TY líquido con 250 µgrs de estreptomycin y 100 µgrs de espectinomycin por mililitro. Los cultivos se incuban con agitación a 28°C hasta alcanzar la fase estacionaria temprana. Los cultivos así crecidos se lavan dos veces con tampón fosfato salino estéril y el precipitado final se resuspende en aproximadamente 1 ml de agua estéril hasta conseguir una concentración de unas 2.5×10^{12} cél/ml. La suspensión celular se mezcla con 1/4 gramos de turba no estéril (1% peso de las semillas) y 2 ml de una solución de sacarosa al 30% (peso/volumen). La relación:turba inóculo es de 1:0'7. La masa así obtenida se mezcló con 140 gramos de semillas de alfalfa cv. Aragón (unas 70.000 semillas) en una relación aproximada de 10^6 células/semilla.

17.2.-Preparación del suelo y siembra de las semillas

Las parcelas experimentales dentro de la EEZ, las mismas de las que se aisló la cepa GR4 en 1975, se labraron 2 semanas antes de efectuar la siembra.

La tarde en que se prepararon las semillas para la siembra, a principios de marzo de 1993, se sembró la alfalfa a mano en una parcela perfectamente acotada de aproximadamente 2x12 metros en donde no se había sembrado alfalfa en los últimos 8 años, dejando entre las zonas inoculada y no inoculada unos márgenes sin sembrar de aproximadamente 1 metro. La parcela control se sembró de forma similar, si exceptuamos que las semillas no fueron inoculadas.

17.3.-Evaluación de la población de campo de *R. meliloti*

La población infectiva de *R. meliloti* en el suelo se determinó según la técnica del Número Más Probable (MPN) (apartado 5.6). La presencia de la cepa liberada se determinó por plaqueo selectivo y fenotipo no mucoide (apartado 5.7) de las cepas procedentes de nódulos con confirmación posterior mediante ensayos de PCR con cebadores específicos de GR4.

También se determinó la presencia de la cepa liberada por plaqueo de diluciones seriadas de suspensiones de suelo sobre placas de TY con los antibióticos selectivos y cicloheximida para evitar la proliferación de hongos además de Rojo Congo para una mejor identificación de *Rhizobium*. Las posibles colonias de GR4SS fueron posteriormente confirmadas como tales por análisis de PCR. Los resultados obtenidos tanto por el método MPN como por plaqueo selectivo fueron similares en todos los casos.

17.4.-Ocupación de nódulos de alfalfa

Desde la liberación de *Rhizobium meliloti* GR4SS se han ido recogiendo periódicamente muestras tanto del suelo inoculado como del suelo control para su análisis por la técnica del Número Más Probable y para la recogida de nódulos directamente desde las plantas de alfalfa mientras su sistema radicular nos lo permitía. Al mes y a los 3 meses de la liberación se recogieron al azar las raíces de 10 plantas de las zonas inoculada y control. En cada caso 50 nódulos se esterilizaron superficialmente (apartado 5.7), se lavaron con agua estéril y se plaquearon sobre TY con y sin antibióticos (Sm, Sp). La cepa liberada podía

también ser identificada frente al resto de población nativa por su fenotipo no mucoide, situación esta que se puede confirmar mediante los ensayos de PCR (**apartado 10**).

Siete meses después de la liberación, el sistema radical de la alfalfa tenía más de 30 centímetros de profundidad y estaba ampliamente extendido en el suelo. Ante la dificultad para obtener nuevos nódulos que nos permitiesen continuar con los ensayos, optamos por recogerlos a los 7 y 14 meses desde macetas en el invernadero sembradas con suelo de las distintas parcelas (**apartado 5.2**). Las muestras de suelo para preparar las macetas las obtuvimos hasta de unos 30 centímetros de profundidad mediante el uso de un cilindro metálico de 10 centímetros de diámetro. Cinco muestras de suelo distintas recogidas de forma aleatoria de las parcelas inoculada y control se utilizaron para preparar 4 macetas por cada muestra de suelo y porción, ya que a su vez cada muestra de suelo se dividió en porciones que se correspondían con tramos de profundidad de 10 centímetros de suelo (**fig. 2**). Entre 60 y 100 nódulos elegidos al azar de las diferentes macetas se analizaron en cada caso para continuar el seguimiento de la cepa liberada y el posible impacto que su liberación pudiese causar sobre la población nativa del suelo.

Los sucesivos muestreos se realizaron utilizando únicamente suelo procedente de los 10 centímetros superiores una vez que comprobamos que la capacidad de penetración de la cepa liberada no superaba la barrera de los 10 centímetros de profundidad.

17.5.-Liberación de *S. fredii* HH102

Esencialmente los pasos seguidos para la liberación de *S. fredii* HH102 son los mismos que empleamos en la liberación de *R. meliloti* GR4SS. A finales de junio de 1994 sembramos 3 parcelas con soja de unos 6 m² cada una, de las que dos fueron inoculadas con *S. fredii* HH102 y una nos sirve como control sin inocular. Sembramos 140 grs de semillas inoculadas con 8×10^8 células/ml de inóculo (136 ml de cultivo DO₆₀₀=0'8; volúmen final=2 ml+ 2 ml sacarosa al 30%). En el otoño de 1994 hicimos la primera recolección, volvimos a sembrar soja la siguiente primavera, y en agosto de 1995 recogimos los nódulos de soja para estudiar la posible transferencia de información genética.

Con la liberación de esta cepa foránea y de la que hasta ese momento carecía el suelo de la EEZ intentamos detectar, mediante el uso de técnicas

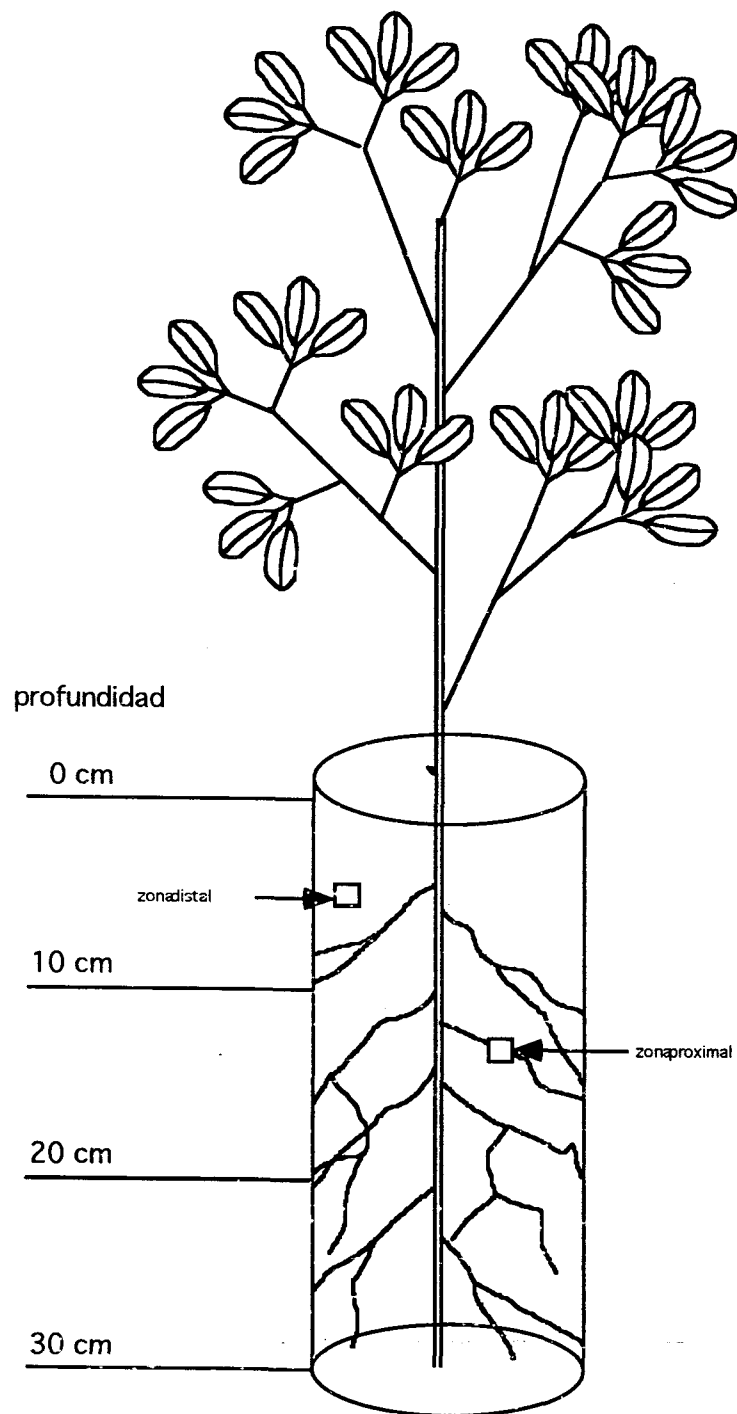


Figura 2: Esquema de la recogida de muestras de suelo con cilindro metálico

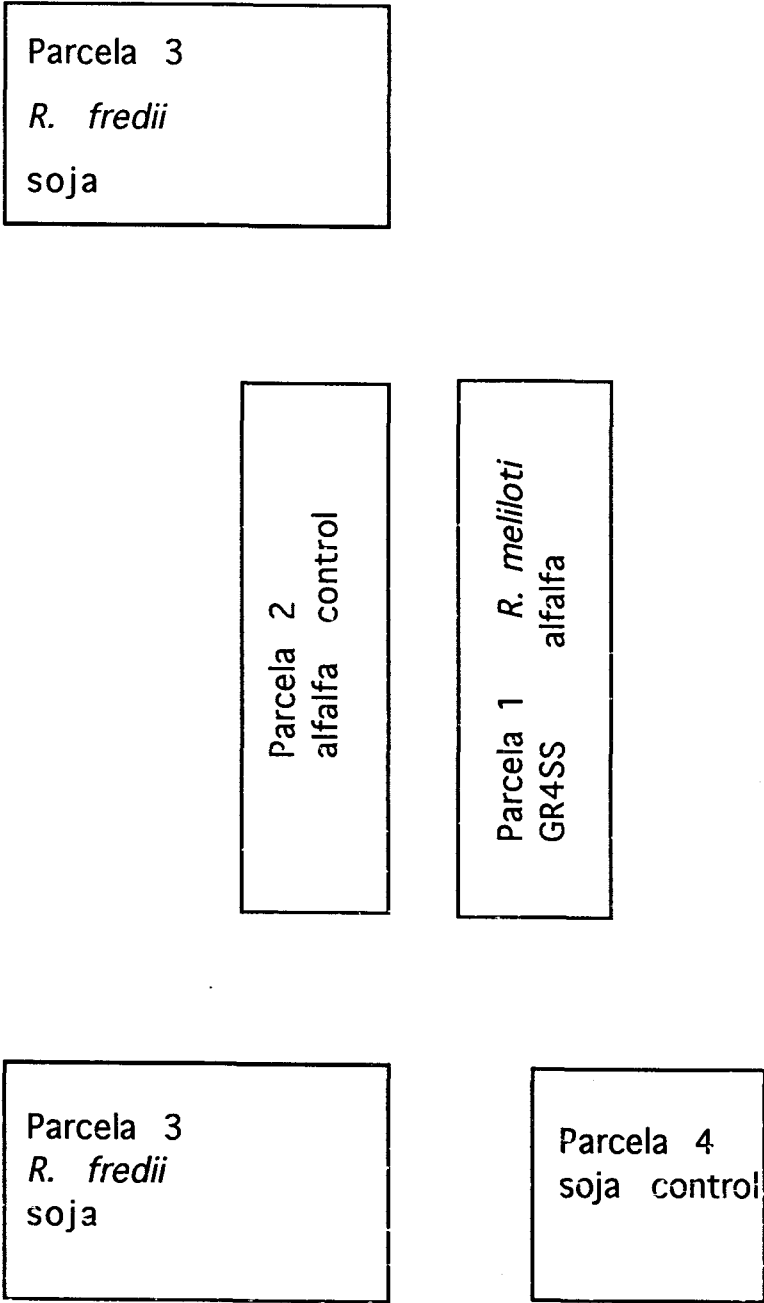
de PCR, posibles transferencias de información genética entre la microflora nativa del suelo y la cepa introducida.

18.-Distintas parcelas de trabajo

La **Figura 3** nos muestra un plano esquemático de las diferentes parcelas en las que dividimos nuestro campo de trabajo. Cada una de estas parcelas tiene un historial distinto en función de la utilización que hacemos de ellas.

Todas las parcelas se encuentran en una zona de la Estación Experimental del Zaidín perfectamente delimitada en la que no se había sembrado alfalfa en los últimos 8 años, con lo cual las poblaciones de *R. meliloti* aisladas allí son un reflejo de la población infectiva nativa que ha permanecido en el suelo sin la presencia de planta hospedadora alguna. En cuanto a la soja, era la primera vez que allí se sembraba, y la presencia de *S fredii* era nula debido fundamentalmente a que ésta es una especie foránea que aún no había sido introducida en la EEZ.

Figura 3: Plano esquemático de las distintas parcelas de trabajo de la EEZ donde realizamos nuestros ensayos.



RESULTADOS Y DISCUSION

1.-Identificación de cepas infectivas de Rhizobium meliloti que llevan plásmidos del tipo pRmeGR4b en poblaciones nativas mediante PCR con cebadores derivados de secuencias de ADN específicas

La cepa GR4 de *Rhizobium meliloti* es una bacteria altamente infectiva y competitiva aislada en 1975 en la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) en Granada, que posee un alto potencial como inoculante. La cepa GR4, además de los plásmidos simbióticos, lleva dos grandes plásmidos crípticos, denominados pRmeGR4a y pRmeGR4b (Toro & Olivares, 1986). Diferentes estudios muestran que la capacidad competitiva de la cepa GR4 está estrechamente ligada a la presencia de una región de ADN denominada *nfe* ("nodule formation efficiency genes") localizada dentro del plásmido pRmeGR4b (Toro & Olivares, 1986; Sanjuan & Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993). En las proximidades de los genes *nfe* se encuentran dos secuencias de inserción, *ISRm3* (Soto *et al.*, 1992a) e *ISRm4* (Soto *et al.*, 1992b), ambas presentes en una única copia en el genoma de GR4. El otro plásmido críptico de GR4, pRmeGR4a, hasta el momento no ha podido ser asociado con la supervivencia ni con la capacidad competitiva de la cepa GR4. El plásmido pRmeGR4a es un plásmido autotransmisible cuya región de replicación ha sido clonada y secuenciada recientemente (Mercado-Blanco & Olivares, 1993 y 1994). Cepas de *R. meliloti* aisladas de nódulos de plantas de alfalfa en la EEZ han sido caracterizadas mediante el uso de técnicas de PCR. La caracterización se basó en la utilización de cebadores derivados de secuencias de inserción (*ISRm3* e *ISRm4*), de la región implicada en la replicación del plásmido pRmeGR4a (*repC*) y de secuencias específicas del plásmido pRmeGR4b. Los aislados del suelo de la EEZ que llevan plásmidos del tipo pRmeGR4b representan la población infectiva

mayoritaria en este campo. Encontramos una correlación directa entre la presencia de plásmidos del tipo pRmeGR4b y la competitividad de las cepas. Además, otras cuatro poblaciones diferentes de *R. meliloti* aisladas de distintos suelos de España se analizaron para la presencia de plásmidos relacionados con pRmeGR4b. Los resultados obtenidos indican que este tipo de plásmido está ampliamente distribuido en las poblaciones de campo de *R. meliloti* y que su frecuencia en la población infectiva depende de la planta huésped.

1.1.-Diseño de cebadores

Los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias de ADN de los elementos de inserción *ISRm3* e *ISRm4*, el gen *repC* de pRmeGR4a, los genes *nfe* y el sitio específico de inserción de *ISRm4* en GR4 (Fig. 4). En la Figura 5 se muestran las amplificaciones únicas y específicas obtenidas con algunas cepas. La utilidad de los distintos cebadores se evaluó inicialmente usando ADNs procedentes de lisados celulares de la cepa nativa GR4 y de sus derivadas curadas GRM6 y GRM10. En el análisis de los aislados de campo, las amplificaciones de *ISRm3* e *ISRm4* se utilizaron para determinar la diversidad de la población de *R. meliloti*, mientras que la amplificación de *repC*, del sitio específico de inserción de *ISRm4* y de los genes *nfe* sirvió para identificar plásmidos de los tipos pRmeGR4a y b, respectivamente.

1.2.-Amplificación con cebadores derivados de elementos IS

ISRm3 se encuentra a 128 pb del gen *nfeD* e *ISRm4* a 1'2 kb de *ISRm3* (Soto *et al.*, 1992a y b). La amplificación de *ISRm3* se hizo usando la pareja de cebadores R31/R32 (Fig. 4) dando lugar a una única banda de amplificación de 530 pb con lisados de las cepas GR4 y GRM10, pero no con lisados de la cepa GRM6, ya que esta última cepa carece del elemento *ISRm3* (Fig. 5A). De la misma forma se efectuaron las reacciones de PCR para el elemento de inserción *ISRm4* utilizando el conjunto de cebadores R43/R44 (Fig. 4), una banda específica aparece igualmente con las cepas GR4 y GRM10 pero con un tamaño de 563 pb, mientras que tampoco se observa ningún producto de amplificación con lisados de GRM6, como era de esperar al carecer esta cepa derivada de GR4 del plásmido pRmeGR4b, y por tanto, también del elemento *ISRm4* (Fig. 5B).

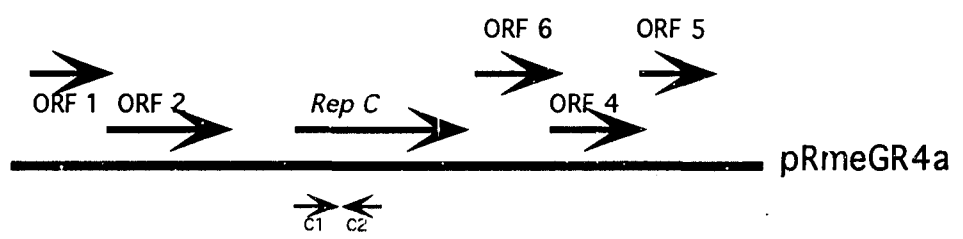
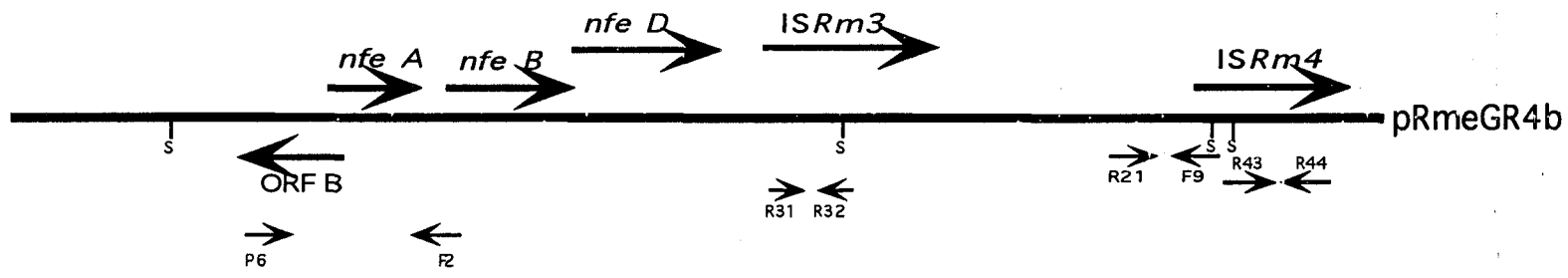


Figura 4 : Esquema de la localización de los distintos cebadores en los plásmidos pRmeGR4b y a utilizados en la clasificación de la población nodulante de *R. meliloti*.

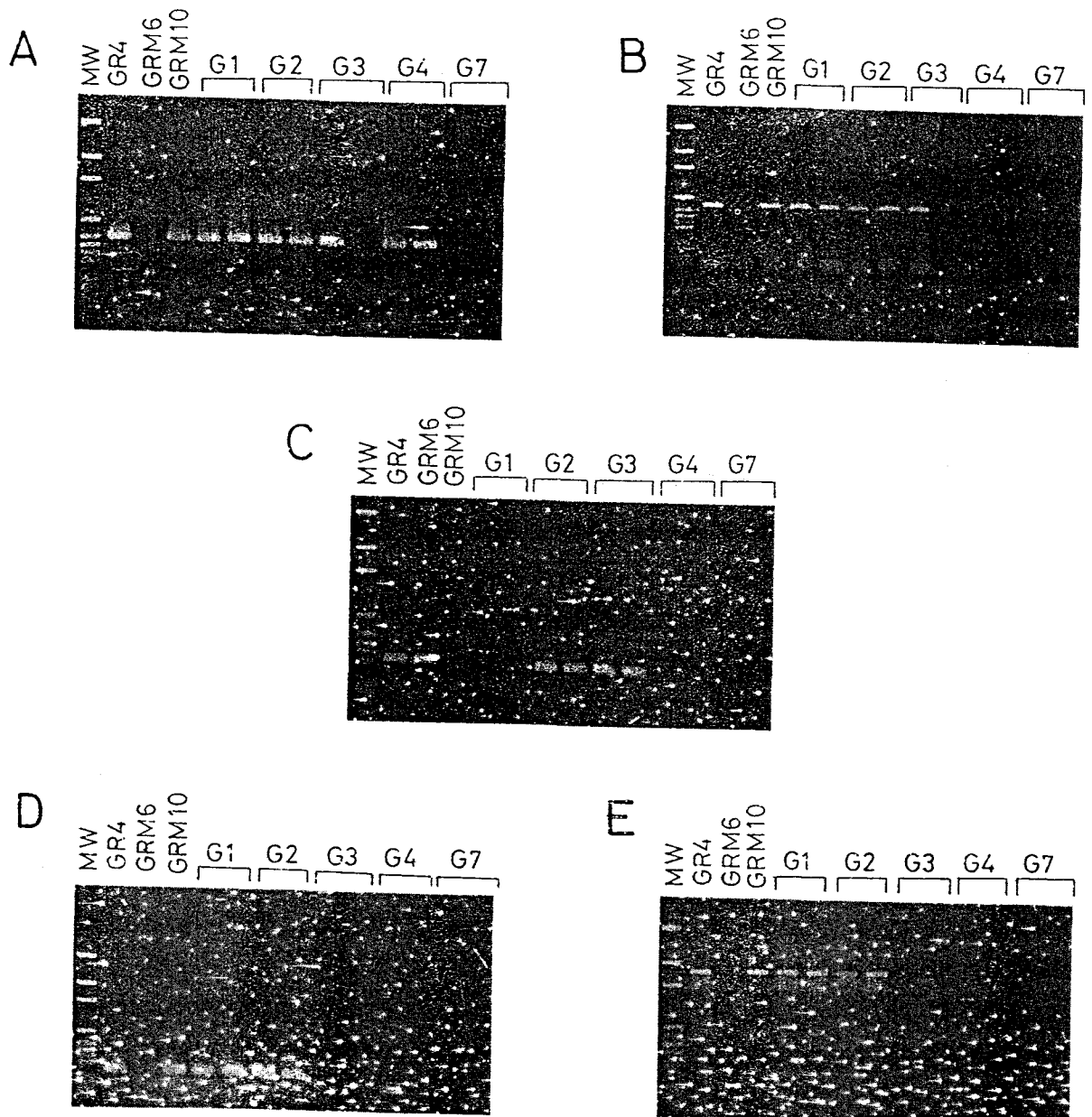


Figura 5. Amplificación por PCR de lisados celulares de Rhizobium meliloti. A: Amplificación para ISRM3; B: ISRM4; C: Gen repC de pRmeGR4a; D: Sitio específico de inserción de ISRM4; E: Genes pfe. Se indican las cepas de R. meliloti empleadas, así como dos aislados de los grupos 1, 2, 3, 4 y 7 de PCR. Se usa el marcador pGEM.

1.3.-Amplificación con cebadores derivados del gen *repC* del plásmido pRmeGR4a

La amplificación específica del gen *repC* de pRmeGR4a (Mercado-Blanco & Olivares, 1994) se hizo con la pareja de cebadores C1/C2 diseñados del extremo 5' codificante (Fig. 4). Para los lisados de las cepas GR4 y GRM6 se obtuvieron amplificaciones específicas de 362 pb, mientras que al ensayar lisados de GRM10 no aparecía amplificación alguna al estar curada esta cepa del plásmido pRmeGR4a (Fig. 5C).

1.4.-Amplificación con cebadores derivados del sitio específico de inserción de *ISRM4* en GR4 y de los genes *nfe*

Para la amplificación del sitio específico de inserción de *ISRM4* en GR4 combinamos un cebador interno a este elemento de inserción con otro externo de la región de ADN adyacente a la repetición invertida izquierda del *ISRM4* de GR4, F9 y R21, respectivamente (Soto *et al.*, 1992b) (Fig. 4). En GR4 y en GRM10 utilizando los cebadores específicos del sitio de inserción de *ISRM4* en GR4 obtuvimos una banda específica de 275 pb, mientras que para GRM6 no se obtuvo ninguna banda tal y como se esperaba (Fig. 5D).

En el caso de los genes *nfe*, mientras GR4 y GRM10 nos dieron una banda específica de 1.425 pb con los cebadores P6 y F2 (Fig. 4), que incluyen el gen *nfeA* (Soto *et al.*, 1993 y 1994), no se observó ninguna banda con lisados de GRM6 (Fig. 5E).

1.5.-Caracterización de la población nativa de *R. meliloti* de la EEZ por PCR

Un total de 100 aislados procedentes de nódulos de alfalfa de la EEZ, previamente ensayados para la nodulación de raíces de alfalfa, se analizaron por PCR con los cebadores mencionados anteriormente, lo que nos permitió clasificarlos en 7 grupos diferentes. (Tabla 7). Dentro del grupo 1 incluimos aquellas cepas que dan amplificación positiva con los cebadores diseñados para el reconocimiento específico del plásmido pRmeGR4b (genes *nfe* e inserción específica de *ISRM4*), incluyendo los dos elementos IS estudiados que se localizan dentro de este plásmido (Figs. 5A, B, D y E), y que no muestran amplificación con los cebadores diseñados para el gen *repC* del plásmido pRmeGR4a (Fig. 5C). Dentro del grupo 2 nos encontramos aquellas cepas cuyos lisados se ven amplificados

Tabla 7. Clasificación por PCR de secuencias de ADN específicas de los aislados de campo de *R. meliloti* de la EEZ (Granada).

Grupo	Características	% nódulos ocupados*
1	tipo pRmeGR4b	20
2	tipo pRmeGR4b y a	25
3	tipo pRmeGR4a	15
4	ISRm3	25
5	ISRm3 +ISRm4	0
6	ISRm4	0
7	ninguna	15

*Se analizaron un total de 100 aislados.

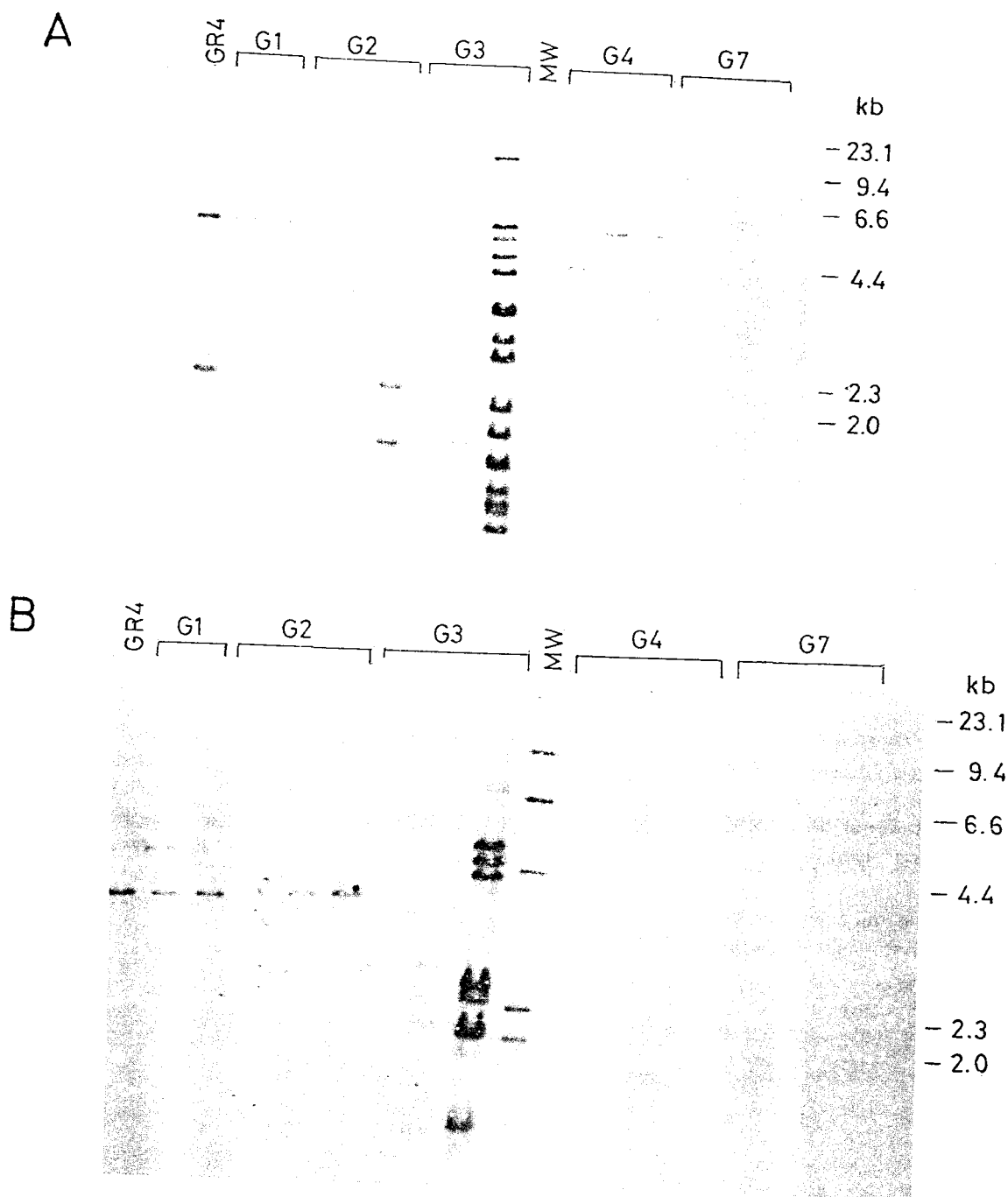


Figura 6. IS-fingerprint de aislados de *R. meliloti* de Granada. A: Con la sonda de 1.3 kb *EcoRI* de *ISRm3*. B: Con la sonda de 0.6 kb *MluI/SacI* interna de *ISRm4*. Se usó el marcador II.

Estos resultados sugieren que los aislados clasificados como portadores del plásmido pRmeGR4b (grupo 1) o de plásmidos relacionados con pRmeGR4a y con pRmeGR4b (grupo 2) pueden considerarse cepas muy relacionadas con GR4, no ocurre lo mismo con los aislados del grupo 3. Los aislados que llevan el plásmido pRmeGR4b ocupan alrededor del 45% de los nódulos de las raíces de alfalfa, lo que les hace representar la población infectiva mayoritaria del campo muestreado. La evaluación de la abundancia de estos grupos por la técnica del Número Más Probable (MPN) revela que, mientras que en las diluciones más bajas de suelo (1:50) las cepas con plásmidos tipo pRmeGR4b ocupan el 50% de los nódulos, en las diluciones más altas de suelo (1:156.250) representan sólo el 16% del total de la población infectiva. Los datos, por tanto, sugieren que los grupos 1 y 2, están formados por cepas altamente competitivas más que por las cepas más abundantes respecto al total de la población infectiva.

1.6.-Frecuencia de plásmidos tipo pRmeGR4b en las poblaciones nativas de *R. meliloti* de distintos suelos

Se estudiaron las poblaciones nativas de *R. meliloti* de otros cuatro suelos procedentes de León y de tres localidades diferentes de Salamanca, cada uno de los cuales con diferente historial en cuanto a cultivos sobre ellos se refiere, para la presencia del plásmido tipo pRmeGR4b.

Los cepas procedentes de León se obtuvieron tras recoger muestras de un suelo en el que nunca se había cultivado alfalfa anteriormente y sembrar con él macetas con diferentes plantas huésped. Todas las cepas procedentes de Salamanca provenían de suelos con un historial de cultivos muy similar, en ellos se alternó el cultivo de alfalfa con el cultivo de cereales. Tanto en Naharros Nuevo como en Parada de Arriba, los nódulos se obtuvieron directamente de las raíces de las plantas de alfalfa que estaban sembradas en ese momento en el campo, mientras que en el caso de las cepas obtenidas en Florida de Liébana no fue posible obtener directamente los nódulos y hubo que sembrar macetas de alfalfa con suelo procedente de ese campo, ya que la alfalfa acababa de ser levantada.

En los análisis por PCR se encontró la presencia de plásmidos del tipo pRmeGR4b en los nódulos de raíz de *M. sativa* de los cuatro suelos ensayados. En los tres suelos procedentes de Salamanca la proporción de cepas con plásmidos del tipo pRmeGR4b se situaba entre el 19 y el 28%, mientras que en el suelo de León se llegó a alcanzar el 48% cuando la planta trampa utilizada para recoger los nódulos fue *M. sativa*. Esto indica que la distribución de plásmidos del tipo pRmeGR4b es muy

amplia entre las distintas poblaciones de campo de *R. meliloti* estudiadas (Tabla 8).

La evaluación por la técnica MPN de la abundancia de aislados que contengan plásmidos relacionados con pRmeGR4b en los suelos de Salamanca indica, al igual que en Granada, que se trata de cepas no demasiado abundantes, de hecho, no pueden ser detectadas en las diluciones de suelo más altas. En el caso del suelo procedente de León, ensayamos también la población nativa aislada de nódulos de otras plantas huésped tales como *M. sphaerocarpa* y *Melilotus alba*. Los datos indican que la presencia de cepas de *R. meliloti* con este tipo de plásmidos es mucho menor que en el caso de *M. sativa*, lo que plantea la cuestión de si la competitividad que parece estar determinada por este tipo de plásmidos depende de la planta huésped, sugiriendo una correlación directa entre la presencia de pRmeGR4b en los aislados de campo y su capacidad para competir con éxito en la formación de nódulos en plantas de alfalfa.

2.-Análisis comparativo de la estructura genética de poblaciones de campo de *R. meliloti* y liberación de *R. meliloti* GR4

La cepa GR4 de *R. meliloti*, que muestra una alta capacidad competitiva para la ocupación de nódulos de raíces de alfalfa en el laboratorio (Toro & Olivares, 1986; Sanjuan & Olivares, 1989; Soto *et al*, 1993) se utilizó en un ensayo de liberación en campo, su supervivencia, ocupación de nódulos e impacto sobre la población nativa de *R. meliloti* fueron objeto de análisis.

Inicialmente caracterizamos la población nativa de *R. meliloti* en el sitio de liberación por ERIC ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus")-PCR e IS ("Insertion Sequence")-"fingerprint". Con estos dos métodos se obtuvo un agrupamiento similar de los aislados. Estos resultados se compararon con los obtenidos previamente mediante el análisis por PCR basado en secuencias específicas derivadas de los plásmidos crípticos pRmeGR4a y pRmeGR4b. Los aislados pertenecientes al grupo infectivo mayoritario, según quedó definido por los tipos de plásmidos dominantes, mostraron unos patrones de ERIC y de IS idénticos

Tabla 8. Presencia de plásmidos tipo pRmeGR4b en diversas poblaciones nativas de *R. meliloti* con diversas plantas huésped.

Localización	Nº aislados	Planta huésped	Aislados con plásmido tipo pRmeGR4b
Salamanca	67	<i>M. sativa</i>	16
Naharros Nuevo (Sa)	31	<i>M. sativa</i>	6
Florida de Liébana (Sa)	15	<i>M. sativa</i>	4
Parada de Arriba (Sa)	21	<i>M. sativa</i>	6
León	50	<i>M. sativa</i>	24
León	33	<i>Melilotus alba</i>	5
León	19	<i>M. sphaerocarpa</i>	2

o muy similares. De esta forma podemos concluir que cualquiera de las tres metodologías ensayadas puede servir para caracterizar la estructura genética de las poblaciones de campo. El posible impacto sobre la población nativa debido a la liberación de GR4 en su entorno natural se examinó a lo largo de los dos años siguientes a la misma. Al cabo de este tiempo no observamos ningún efecto sobre la estructura genética de la población de *R. meliloti* aislada de nódulos de alfalfa en el sitio de liberación.

2.1.-Caracterización de la población nativa de *R. meliloti* de la EEZ por "ERIC-" e "IS-Fingerprinting"

Seleccionamos 22 cepas representativas de los 100 aislados analizados por PCR en el apartado 1.5 (Tabla 9) en base a secuencias específicas para discernir si el agrupamiento basado en la presencia de los plásmidos tipo pRmeGR4a y pRmeGR4b coincide con la estructura genética de las poblaciones de campo determinada mediante otras metodologías.

Se usó el cebador ERIC2 para la amplificación por PCR y la generación de patrones específicos de cada cepa ("ERIC-Fingerprint") (Fig. 7). Los dendrogramas generados por el programa WinCam con una similitud del 80% agrupaba los distintos aislados en nueve grupos. El límite del 80% fue el elegido porque el análisis de reacciones independientes de ERIC-PCR de la misma cepa corridas en distintos geles nos daba valores similares en un rango que varía entre el 80 y el 100%. El grupo I contenía el 45% de la subpoblación ensayada incluyendo la cepa GR4, 3 grupos contenían dos o tres aislados y cinco aislados mostraban patrones individuales.

Para continuar con la caracterización de estos aislados estudiamos la presencia y número de copias de un conjunto de siete secuencias de inserción (ISs) de diferentes cepas de *R. meliloti* por hibridación con el ADN total de los aislados estudiados (Fig. 8). Las cepas con patrones idénticos o casi idénticos se incluyeron dentro del mismo grupo. Los 10 aislados del grupo A, aunque difieren ligeramente en el número de copias de alguno de los ISs, presentan un patrón muy similar y representan el grupo mayoritario en base al "IS-Fingerprint" generado. De la misma forma los aislados de los subgrupos B y J muestran patrones muy parecidos. La clasificación se hacía más obvia con el uso del elemento ISRm2011-2, ya que éste era el único elemento que estaba presente en todos los aislados ensayados y con un elevado número de copias

Tabla 9. Aislados de la EEZ representativos de los distintos grupos basados en secuencias específicas de los plásmidos pRmeGR4a y b generados por PCR.

Características	Cepas
Tipo pRmeGR4b	RMGRA14, RMGRA111, RMGRA315 y RMGRA 318
Tipo pRmeGR4b+a	RMGRA13, RMGRA19, RMGRA213, RMGRA216 y RMGRA 313
Tipo pRmeGR4a	RMGRA 12, RMGRA214 y RMGRA218
ISRm3*	RMGRA18, RMGRA219, RMGRA312, RMGRA314, RMGRA316 y RMGRA 319
Ninguna**	RMGRA17, RMGRA212 y RMGRA215

*Aislados que sin llevar ninguno de los plásmidos tipo pRmeGR4a y/o b llevan ISRm3.

**Aislados que no rinden productos amplificados con ninguno de los cebadores de los plásmidos o de secuencias IS utilizados.

% similarity

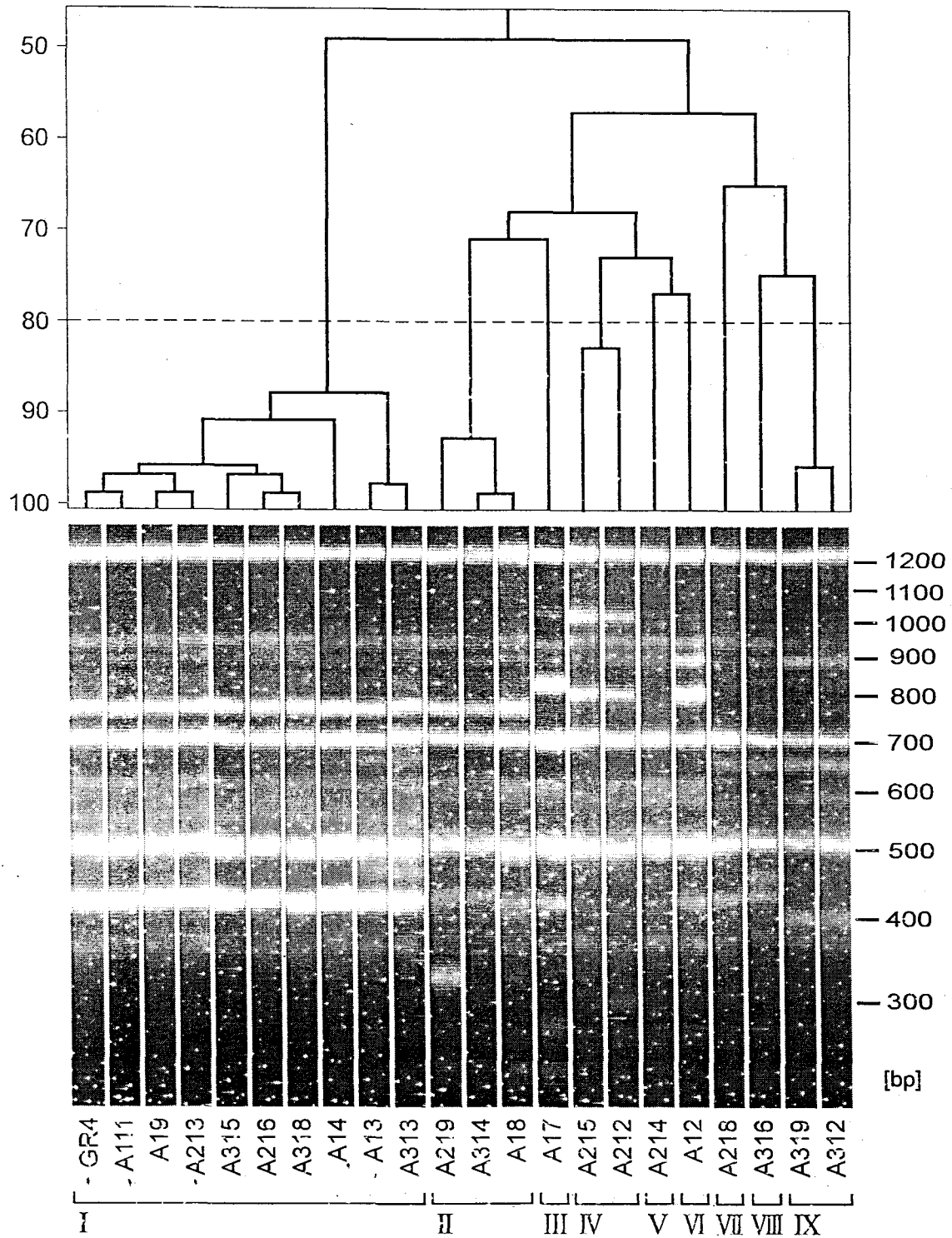


Figura 7. Grupos ERIC de 22 aislados de la EEZ. Se muestran los patrones de PCR con tamaños de 200 a 1200 pb. El dendrograma se calculó por el método de Dice y Pearson, con un nivel de similitud del 80%.

200 2000 200

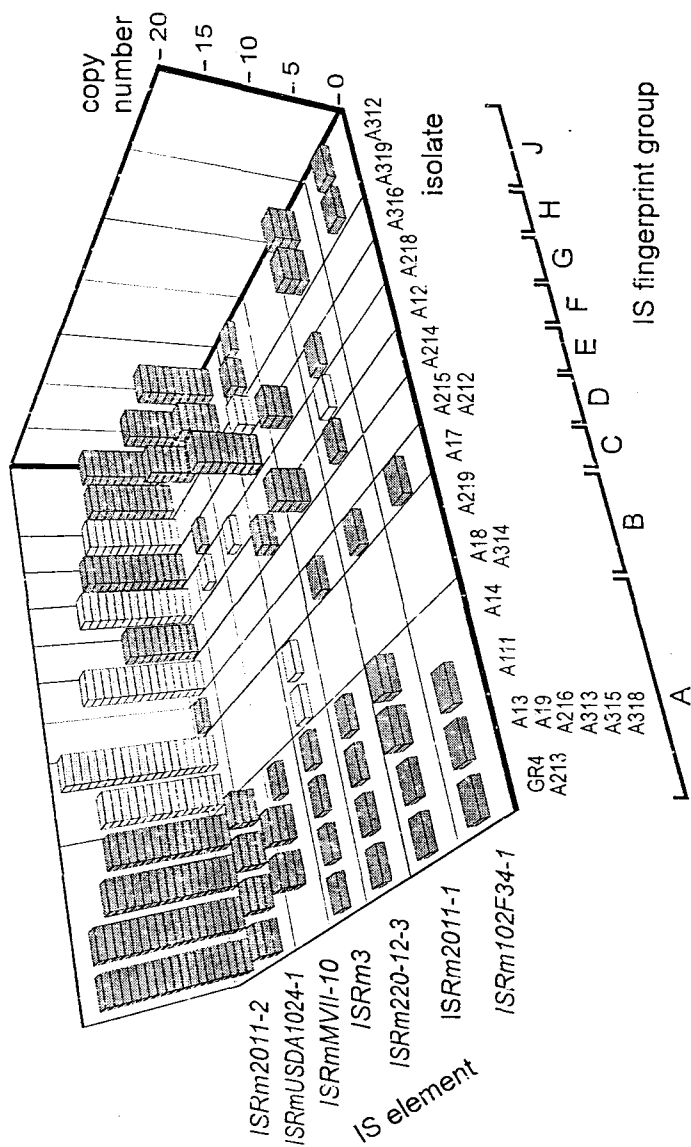


Figura 8. Distribución y número de copias de 7 elementos IS en 22 aislados de la EEZ. Se indican los aislados con similares patrones de hibridación.

que variaba entre 9 y 19, salvo en la cepa RMGRA17 que sólo poseía una copia, de hecho, ya se sabía de la amplia distribución y alto número de copias de este elemento de inserción en *R. meliloti* (Kosier *et al.*, 1991; Selbitschka *et al.*, 1995). Los otros 6 elementos de inserción aparecen sólo en algunos aislados con un número de copias que varía entre 1 y 9. Dos de los aislados, RMGRA215 y RMGRA212, sólo llevan el elemento *IS_{Rm2011-2}*, mientras que el grupo de RMGRA13 y el aislado RMGRA111 llevan los 7 elementos de inserción ensayados.

2.2.-Comparación de los grupos de "ERIC"- e "IS-Fingerprint" con la distribución de los plásmidos tipo pRmeGR4a y b

Si comparamos los grupos generados por cada una de estas técnicas podemos observar que cada grupo ERIC incluye aislados cuyos patrones IS son muy similares o incluso idénticos (Fig. 9). Así, parece como si el agrupamiento generado por los patrones IS confirmase el agrupamiento realizado en base a los patrones ERIC, haciéndonos pensar que ambas técnicas son un reflejo de las relaciones genéticas existentes entre los distintos aislados. Podríamos sugerir que cada grupo ERIC o IS representa en realidad una única cepa o un grupo de cepas derivadas de una cepa inicial. Los aislados de un mismo grupo IS generan el mismo patrón básico. Las pequeñas variaciones que encontramos en el número de copias podrían deberse a transposiciones en el caso de la existencia de copias adicionales. Las ligeras diferencias que se pueden observar en los patrones podrían también ser el resultado de recombinaciones (inversiones o deleciones) entre dos copias del mismo elemento IS. Concluimos, por tanto, que el patrón ERIC refleja la estructura genética de la población rizobiana y que una diferenciación más detallada entre los aislados se puede obtener comparando los patrones IS.

A pesar de que los diferentes grupos ERIC eran muy homogéneos con respecto a la distribución de sus patrones IS, algunos subgrupos carecen de uno u otro elemento, por ejemplo, *IS_{RmMVII-10}* en GR4 y RMGRA213 (Fig. 8). Si asumimos que cada grupo ERIC o IS representa a individuos relacionados, tanto GR4 como RMGRA213 habrían perdido este elemento o el resto de aislados pertenecientes al grupo A de IS lo podrían haber adquirido por transferencia genética horizontal. Las diferencias que existen en cuanto al número de copias probablemente puedan deberse a transposiciones.

isolate	ERIC-PCR groups	IS fingerprint groups	plasmid types (a/b)
GR4 A213	I	A ₁	a + b
A13 A19 A216 A313		A ₂	
A315 A318 A111		A ₃	b
A14			
A18 A314 A219	II	B	-
A17	III	C	-
A215 A212	IV	D	-
A214	V	E	a
A12	VI	F	a
A218	VII	G	a
A316	VIII	H	-
A319 A312	IX	J	-

Figura 9. Comparación de los grupos formados por ERIC, IS y la presencia de los plásmidos pRmeGR4a y b.

También comparamos la distribución de los plásmidos del tipo pRmeGR4a y b y el agrupamiento de aislados basado en la distribución de patrones ERIC. En todos los aislados del grupo I de ERIC encontramos la presencia de plásmidos del tipo pRmeGR4b, del que carecían el resto de grupos ERIC. Estos resultados podrían reflejar una asociación preferencial del plásmido pRmeGR4b con un determinado fondo genético. De la misma forma que se ha observado una correlación entre plásmidos sym y determinados genotipos cromosómicos en poblaciones de campo de *R. leguminosarum* (Schofield *et al.*, 1987; Young & Wexler, 1988). Sin embargo, la presencia de plásmidos del tipo pRmeGR4a sólo se detectó en algunos aislados de campo del grupo I de ERIC que llevan ambos plásmidos y en otros 3 aislados (RMGRA12, RMGRA214 y RMGRA218) que representaban grupos ERIC individuales (Fig. 9). La presencia de plásmidos del tipo pRmeGR4a en grupos ERIC distintos del grupo I podría reflejar sucesos de transferencia genética horizontal, teniendo en cuenta que el plásmido pRmeGR4a de GR4 es autotransmisible, mientras que pRmeGR4b es sólo movilizable por pRmeGR4a.

Comparando los tres métodos de clasificación de aislados de *R. meliloti* que hemos utilizado podemos concluir que los tres métodos son útiles a la hora de describir la estructura genética de poblaciones de campo.

2.3.-Características iniciales de la población nativa de *R. meliloti* en el suelo de la EEZ y liberación de la cepa GR4

La cepa GR4SS es un mutante espontáneo resistente a estreptomicina y espectinomicina derivado de la cepa GR4. GR4SS y GR4 muestran curvas de crecimiento, infectividad y competitividad semejantes (Soto, comunicación personal).

La parcela de la EEZ en donde se han llevado a cabo nuestros trabajos no ha tenido cultivos de alfalfa en los últimos 8 años. Así, la población de campo aislada y posteriormente caracterizada en el desarrollo de estos trabajos refleja la población nativa de *R. meliloti* que ha permanecido en el suelo durante un largo periodo de tiempo en ausencia de la planta huésped. Por la técnica del Número Más Probable (MPN) determinamos, en marzo de 1993, antes de plantar alfalfa que la población nativa de *R. meliloti* de la EEZ se situaba en el rango que comprende desde 2.7 a 18.6×10^4 células por gramo de suelo seco con un límite de confianza del 95%. El recuento del número de células a liberar nos dió unos valores de $2-3 \times 10^{10}$ ufc/ml, por tanto el número total de células liberadas estaba en torno a las 10^{12} . La misma estimación que antes de la liberación se

obtuvo para la población infectiva un mes después de plantar alfalfa en la zona control, mientras que en la zona inoculada el rango se situaba entre $5'4$ y $42'6 \times 10^4$ células/gramo de suelo seco. Al mismo tiempo se estimó la presencia de la cepa liberada GR4SS en un rango de $2'7$ a $18'6 \times 10^4$ células por gramo de suelo seco. Así parece que la liberación de la cepa GR4SS se hizo en unos niveles similares a los de la población infectiva nativa de *R. meliloti*.

2.4.-Persistencia de la cepa liberada

La persistencia de la cepa liberada *R. meliloti* GR4SS se ha analizado durante dos años. Las estimaciones del número de células de la cepa liberada, así como de la población nativa de *R. meliloti* después de la liberación están gráficamente representadas en la **Figura 10** y **Tabla 10**. La variación de la cepa liberada, que se reduce 10^3 veces al cabo de dos años, es significativamente mayor que la variación que experimenta la población nativa. Curiosamente, una reducción similar se observó en el otoño del primer año después de la liberación (a los 7 meses de la misma), aunque la población de la cepa liberada vuelve a aumentar en una proporción de 10^2 veces la siguiente primavera (14 meses después de la liberación). No es posible saber cuales son las razones de los cambios que se observan, pero podrían estar relacionados con factores medioambientales tales como la temperatura, el aporte de agua, etc., que podrían afectar de forma más severa a la cepa introducida que a la población nativa.

Se ha analizado también la distribución de la cepa liberada en relación con la profundidad del suelo, para ello utilizamos un cilindro de acero de 10 centímetros de diámetro con el que profundizamos en el suelo para extraer muestras de hasta una profundidad de 30 centímetros (**Fig. 2**). Las muestras se tomaron tanto de la zona control como de la zona inoculada. Las muestras de suelo obtenido con el cilindro metálico se dividieron en tres partes, cada una de las cuales se corresponde con 10 centímetros de profundidad desde la superficie. A su vez se hizo un análisis independiente de la zona de suelo proximal y distal a las raíces de alfalfa. El análisis a estas tres profundidades se llevó a cabo únicamente a los 7 y 14 meses de la liberación.

Tabla 10. Estimación, por la técnica del Número Más Probable (MPN), de las poblaciones nativas y de la cepa liberada de *R. meliloti*.

Meses después de la liberación	Campo control (x10 ⁴)	Cepa liberada (x10 ⁴)
9 días (marzo 1993)	25	25
3 (junio 1993)	25	1'4
7 (octubre 1993)	15	0'054
14 (mayo 1994)	6	2'9
17 (agosto 1994)	150	2
24 (marzo 1995)	10	0'01

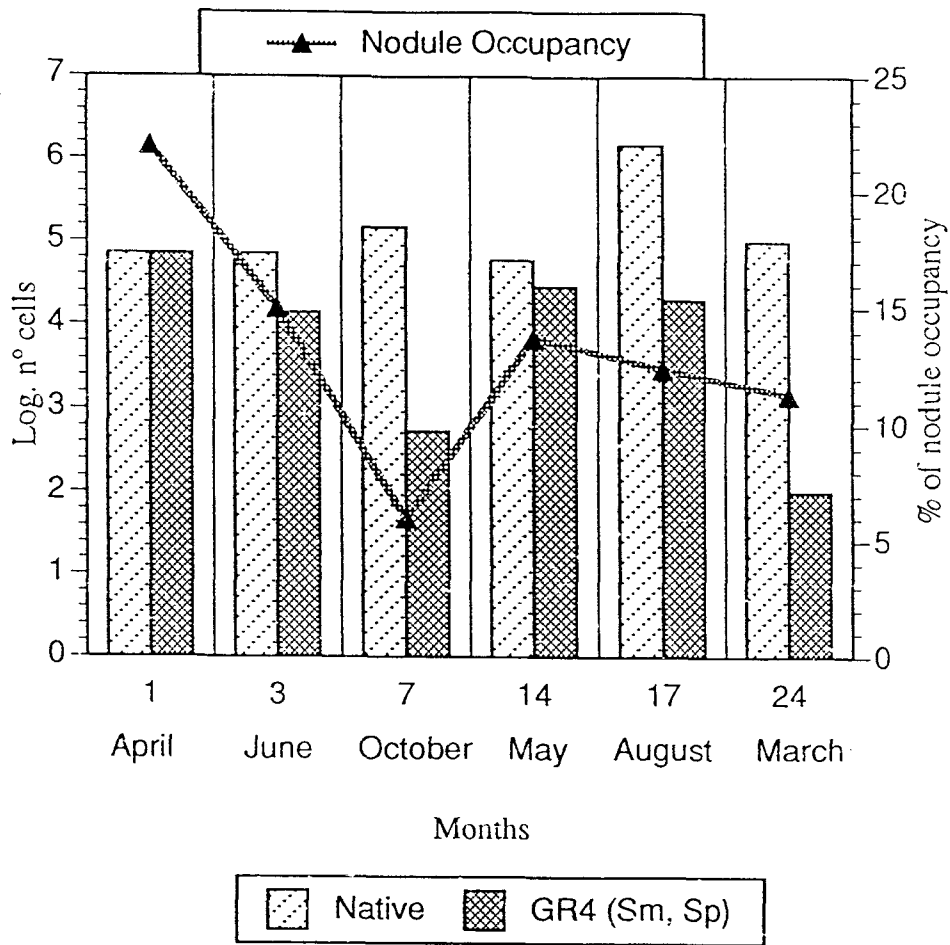


Figura 10. Estimación de la evolución de la población nativa y de la cepa liberada. Se indica también la ocupación de nódulos.

En los 10 centímetros superficiales de suelo encontramos la cepa liberada en cantidades de alrededor de las 10^3 células/gramo de suelo, duplicándose en la zona próxima a la raíz. El número de células de la cepa liberada se sitúa también entorno a las 10^3 células/gramo de suelo en la zona proximal que va de los 10 a los 20 centímetros de profundidad, y decae un orden de magnitud si nos referimos a la zona distal. En las muestras que comprenden una profundidad de entre 20 y 30 centímetros, no fuimos capaces de detectar la cepa GR4SS. A los 14 meses de la liberación la cepa GR4SS sólo pudimos encontrarla entre las cepas aisladas de los primeros 10 centímetros de profundidad, en unos niveles que rondaban las 10^4 células/gramo de suelo.

2.5.-Porcentaje de nódulos ocupados por la cepa liberada

Lo mismo que se observa con su persistencia en el suelo, el porcentaje de nódulos ocupados por la cepa liberada también sufrió fuertes variaciones como puede verse en la **Figura 10** y **Tablas 10** y **11**. Aunque la cepa liberada tuvo un descenso de más de dos órdenes de magnitud desde agosto de 1994 (17 meses después de la liberación) a marzo de 1995 (24 meses después de la liberación), no se observan diferencias significativas en el número de nódulos ocupados por la cepa liberada, que podría explicarse debido a la elevada capacidad competitiva de dicha cepa.

2.6.-Impacto de la liberación de *R. meliloti* GR4 sobre la población nativa de *R. meliloti* de la EEZ

Cuando los niveles de la cepa inoculada permanecieron estables durante al menos 3 meses, esto es, a los 17 meses de la inoculación, en unos valores próximos a las 10^4 células por gramo de suelo seco, ensayamos si la población nativa había sufrido cambios en respuesta a la liberación. Recogimos 5 muestras de suelo diferentes de las zonas inoculada y control y preparamos con cada una de ellas 4 macetas. De cada grupo de macetas recogimos entre 100 y 150 nódulos. Al total de los aproximadamente 500 aislados de cada una de las zonas, inoculada y control, lo sometimos al análisis de PCR para determinar la presencia de plásmidos de los tipos pRmeGR4a y b, y los clasificamos en tres grupos (**Tabla 12**). Grupo 1 para aquellas cepas que llevan el plásmido del tipo pRmeGR4b sólo o ambos plásmidos conjuntamente, y que se corresponde

Tabla 11. Porcentaje de ocupación de nódulos por la cepa liberada *R. meliloti* GR4SS.

Meses	% nódulos ocupados
1	22
3	15
7	6
14	13'7
17	12'4
24	11'3

Tabla 12. Comparación de la población nativa de *R. meliloti* en los campos inoculado y control 17 meses después de la inoculación.

Grupos	Tipo de plásmido	*% aislados de campo control	*% aislados de campo inoculado
1	Tipo pRmeGR4b y pRmeGR4a y b	39'60±6'30	41'80±3'19
2	Tipo pRmeGR4a	14'20±5'71	14'00±3'49
3	-	46'20±10'10	44'20±4'13

*Intervalo de confianza del 95%.

con el patrón I de ERIC (**Fig. 9**); **grupo 2** que recoge los aislados que sólo tienen plásmidos del tipo pRmeGR4a (patrones V, VI y VII de ERIC) y el **grupo 3** que incluye a aquellas cepas que no llevan ninguno de estos dos tipos de plásmidos y que se corresponden con el resto de patrones de ERIC. El tratamiento estadístico de los datos, mostrado en la **Tabla 12**, indica que la inoculación del campo con la cepa GR4SS no provoca cambios significativos ($P > 0.05$) en ninguno de los grupo mencionados anteriormente. Lo que sí parece claro es que no existe ninguna variación en el grupo infectivo mayoritario (40% de la población infectiva) en respuesta a la liberación de la cepa GR4SS, que también pertenece a este grupo. En cualquier caso no podemos descartar pequeños efectos en alguno de los restantes grupos de PCR, estos pequeños efectos podrían haberse enmascarado por el agrupamiento de cepas que supone el propio análisis. Para poder detectar estas posibles variaciones sería necesario el análisis de un mayor número de aislados.

3.-Identificación de elementos genéticos como marcadores en el análisis de la adquisición de genes por cepas inoculantes desde la población autóctona del suelo

Uno de los principales objetivos de este trabajo y del proyecto de investigación que lo apoya era determinar posibles transferencias de información genética desde la microflora del suelo a cepas inoculantes. Para poder llevar a cabo este objetivo el primer paso a seguir era seleccionar los posibles elementos genéticos que se podrían utilizar como marcadores para la identificación de sucesos de transferencia genética en el suelo.

En nuestro caso elegimos los elementos IS. La elección de estos elementos de inserción como marcadores de transferencia genética se hizo en base a: 1) la capacidad de transposición a las distintas partes del genoma que tienen estas secuencias lo que podría facilitar por un lado su transferencia por distintas vías y de otro su supervivencia en las cepas receptoras; 2) su abundancia relativa dentro de la población nativa de *Rhizobium* del suelo, lo que haría más factible su posible detección en un suceso de transferencia. Dos secuencias de inserción, *ISRm3* e *ISRm4*, presentes en la cepa *R. meliloti* GR4 se tomaron como marcadores genéticos en los estudios de transferencia llevados a cabo. La secuencia de inserción *ISRm3* en GR4 se localiza en el plásmido

pRmeGR4b cercano al locus *nfe*, ésta es una secuencia de inserción homóloga a la secuencia *ISRm3* descrita para *R. meliloti* 102F70 (Wheatcroft & Laberge, 1991; Soto *et al.*, 1992a). En el caso del elemento *ISRm4* de GR4, que también se encuentra en el plásmido pRmeGR4b (Soto *et al.*, 1992b), presenta homología con el IS402 de *P. cepacia*. *ISRm3* se encuentra en el 90% de la población infectiva de *R. meliloti* del suelo de la EEZ, mientras que *ISRm4* lo lleva el 60% de la misma. En general, aunque se consideraba que la presencia de elementos IS en *Rhizobium* suele ser específico a nivel de especie, la presencia, por ejemplo, de secuencias homólogas a *ISRm3* de *R. meliloti* ya había sido descrita anteriormente en algunas otras cepas de *R. leguminosarum* bvs. *phaseoli* y *viciae* (Wheatcroft & Laberge, 1991), aunque el análisis no se había llevado a cabo a nivel de poblaciones. Así mismo, era necesario disponer de una metodología fácil, suficientemente sensible y rápida que permitiese la identificación de este tipo de secuencias en muestras de la población de la cepa liberada, estos objetivos los cumple la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.1.-Determinación de la presencia de los elementos de inserción *ISRm3* e *ISRm4* en la población de *R. meliloti* de la EEZ mediante PCR.

Utilizando las parejas de cebadores R31/R32, específicos para el elemento *ISRm3* de *R. meliloti*, y R43/R44, específicos para *ISRm4*, se determinó la presencia de estos dos elementos de inserción en nuestra propia colección de cepas infectivas de *R. meliloti* obtenidas de nódulos de alfalfa en la EEZ.

En el caso de *ISRm3* el porcentaje total de cepas que llevan dicho elemento se situaba en torno al 80-90%; mientras que para el elemento de inserción *ISRm4*, el porcentaje rondaba el 60%.

3.2.-Identificación de secuencias de inserción homólogas a la *ISRm3* de *R. meliloti* en poblaciones nativas de *R. leguminosarum* bv. *viciae*

ISRm3 es un elemento de inserción de 1'27 kb ampliamente distribuido en *R. meliloti*. Mediante técnicas de hibridación ADN-ADN se determinó que existen elementos homólogos a *ISRm3* en poblaciones nativas de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Se analizaron aislados representativos de cinco poblaciones europeas distintas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* para la presencia de elementos de inserción homólogos a *ISRm3* de *R. meliloti* GR4. Mientras que

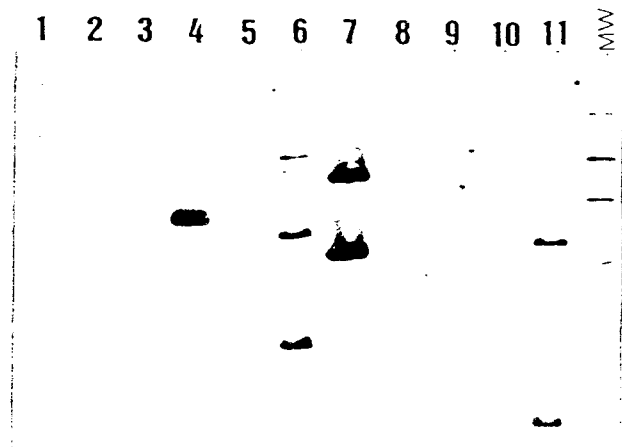
en la población de la EEZ de Granada no encontramos ninguna hibridación con la sonda de *ISRm3* utilizada (fragmento *EcoRI*27 de 1'27 pb-Soto *et al.*, 1992a) se observaron fuertes señales de hibridación con otros aislados de *R. leguminosarum* procedentes del resto de colecciones europeas ensayadas. Tres de los diez aislados procedentes de Rothamsted (Reino Unido) mostraban homología con *ISRm3* y sus patrones de hibridación eran distintos entre ellos (**Fig. 11A**). De los 12 aislados procedentes de Dijon (Francia), 4 presentaban homología con *ISRm3* y mostraban idénticos patrones de hibridación a pesar de estar clasificados en dos clases cromosómicas diferentes y presentar distintos perfiles de plásmidos (N. Amarger, comunicación personal) (**Fig. 11C**). De Alemania teníamos 8 cepas procedentes de Erlangen de las que 7 hibridaban con la sonda de *ISRm3*, y 4 de los cinco aislados procedentes de Schlüterhof presentaban también homología con este elemento de inserción (**Fig. 11B**). Los patrones generados por estos eran idénticos para la misma localización geográfica y distintos entre ambas regiones. Las cepas de Schlüterhof presentaban un patrón de hibridación similar al de las cepas procedentes de Dijon lo que podría sugerir una estrecha relación entre estas dos poblaciones. La similitud de perfiles de hibridación de las cepas de Erlangen (**Fig. 11B, carriles 1 al 6 y carril 8**) y de la cepa FIS4 (**Fig. 11A, carril 4**) de Rothamsted sugiere también alguna relación entre ellas.

El elemento de inserción *ISRm3* de *R. meliloti* tiene un único sitio de restricción *SalI* a unos 500 pb de la repetición invertida derecha. Su hibridación con ADN genómico de GR4 digerido con *SalI* resulta en dos bandas de hibridación de 5 y 2 kb aproximadamente (**Fig. 11**). Nuestros resultados, en los que sólo nos aparecen 1 ó 2 bandas de hibridación (durante la electroforesis se perdieron los fragmentos de tamaño inferior a 1 kb), indican que el elemento *ISRm3* está presente en una única copia.

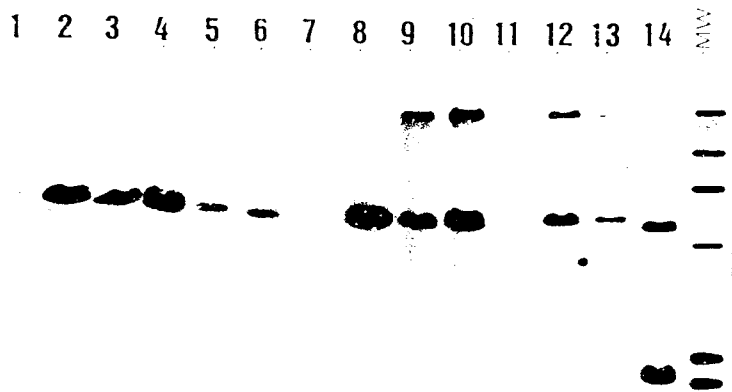
3.3.-Secuenciación del elemento homólogo a *ISRm3* de *R. meliloti* en la cepa de *R. leguminosarum* bv. *viciae* B10 y diseño de cebadores para su reconocimiento por PCR

A pesar de disponer de buenos cebadores oligonucleotídicos, como son R31/R32, con los que amplificar el ADN correspondiente al elemento de inserción *ISRm3* de *R. meliloti*, para la amplificación por PCR de los elementos homólogos a *ISRm3* en *R. leguminosarum*, los cebadores R31/R32 daban señales muy débiles de tamaño similar al esperado (533

A



B



C



Figura 11. Presencia de elementos homólogos a ISRm3 en poblaciones nativas de R. leguminosarum bv. viciae. A: Aislados de Rothamsted (Reino Unido), son positivos los FIS4, 6 y 7. B: Aislados de Erlangen (Alemania), carriles 1 a 8, no híbrida B150. Los carriles 9 al 13 se corresponden con aislados de Schlüterhof, no híbrida F3-61 C: Aislados de Dijon (Francia), fueron positivos SA10, SC14, BA7, BA11. GR4 es siempre la última cepa antes del marcador II.

pb) o/y productos de amplificación inespecíficos, como ocurría con la cepa B10 procedente de Erlangen (**Fig. 11B, carril 2**), y esto probablemente era debido a la existencia de errores en las zonas de apareamiento de estos cebadores en el genoma de *R. leguminosarum*. Para comprobar que tales señales indicaban la presencia de este elemento de inserción, diseñamos nuevos cebadores a partir de la secuencia de *ISRM3* de GR4, hicimos las posibles combinaciones de parejas de cebadores para determinar su eficiencia en reacciones de PCR. Obtuvimos que el nuevo cebador R35, combinado con el R32 nos proporcionaba amplificaciones mucho más claras en cepas de *R. leguminosarum*. Clonamos la amplificación de ADN de *R. leguminosarum* B10 obtenida con los cebadores R35/R32 en el vector pGEM-T. El plásmido recombinante fue marcado con digoxigenina e hibridado sobre el ADN original digerido con *Sall* para comprobar que su procedencia era la correcta, el patrón de bandas obtenido fue similar al que se obtuvo con la sonda del elemento *ISRM3* de *R. meliloti*. Posteriormente secuenciamos el producto de la amplificación del ADN de *R. leguminosarum* B10 obtenido con los cebadores R35/R32, usando estos mismos cebadores y los propios del vector pGEM-T, Sp6 y T7.

La secuencia de ADN del *ISRM3* de *R. leguminosarum* B10 muestra un 98% de identidad con la de *R. meliloti* GR4 a lo largo de un fragmento de 490 pb (**Fig. 12A**); y en las secuencias de proteína deducidas de las posibles transposasas la identidad es del 90% (**Fig. 12B**).

La pareja de cebadores R35/R32 fue capaz de amplificar en otras cepas de *R. leguminosarum* que contenían elementos homólogos a la secuencia *ISRM3* de *R. meliloti* GR4, y no solamente con la cepa B10 (**Figura 13**). Así, esta pareja de cebadores podría utilizarse en la determinación de la presencia de este elemento tanto en poblaciones nativas de *R. meliloti* como en poblaciones nativas de *R. leguminosarum*.

Nuestros resultados indican que la presencia del elemento de inserción *ISRM3* no se reduce únicamente a *R. meliloti*, sino que se pueden encontrar secuencias de inserción similares a ésta en distintas cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* de distinta procedencia. El alto grado de homología entre las distintas secuencias de inserción *ISRM3* de ambas poblaciones rizobianas podría sugerirnos un origen común entre ellas y, por tanto, que la distribución de las mismas sea el resultado de sucesos de transferencia horizontal de material genético en el suelo.

A

```

R31 ----->
GR4 ISRm3 TTCTGGACCA GCTCCTGGTT..... .G.....
B10 ISRm3      ND ..... .A.....
Consensus      ND      GGACGTGATC CR TCCGAGGT TTTGGCAAG 50
R35 |-----

GR4 ISRm3 .....
B10 ISRm3 .....
Consensus GACGGTTTGC TGGACGATCT GAAGAAGGCG CTTTCAGAGC GCATCCTCAA 100
->

GR4 ISRm3 ..... .AC..
B10 ISRm3 ..... .CG..
Consensus TCGGGAMSTT GACGACCATC TCGACGTCEG GCGCCTGGAG GCGGCCCCG 150
GR4 ISRm3 .....
B10 ISRm3 .....
Consensus CCAACAGGCG CAACGGTTCC TCCAAGAAGA CGGTTTTGAC TGGCACATCG 200
GR4 ISRm3 .....
B10 ISRm3 .....
Consensus AAGATGACGC TGACCATCCC GCGTCGATCG GCGGGTACC TTCGACCCAA 250
GR4 ISRm3 ..... .G.-
B10 ISRm3 ..... .A.
Consensus AGCTGATACG CCAGRTATCA AGCGCCGGTT TCCCATTTC GACGATAAGA 300
GR4 ISRm3 ..... .T.
B10 ISRm3 ..... .C.
Consensus TCATTTTCGAT GTACGCCCCGT GGTATGACAG TCGCGGAGAT YCAGGGGCAT 350
GR4 ISRm3 .....
B10 ISRm3 .....
Consensus CTTGAAGAGC TCTACGGCAT CGATGTGTTCG CCGGATCTGA TCTCGCCGGT 400
GR4 ISRm3 ..... .C.G.
B10 ISRm3 ..... .T.A.
Consensus GACCGATACG GTTCTGGAGG CCGTYGRAGA GTGGCAAAC CGGCCGCTCG 450
GR4 ISRm3 .....
B10 ISRm3 .....
Consensus AGCTTTGCTA CCCCCTCGTG TTTTTCGACG CCATCCGGGT CAAGATCAGA 500

<----- R32
GR4 ISRm3 ..... TACGCAA CAAAGCCGTC TAT 533
B10 ISRm3 ..... ND
Consensus GACGAGGGCT TCG      ND

```

B

```

B10 ..... DV .....
GR4 ..... EL .....
Consensus GRDPSEVFGK DGLLDDLKKA LSERILNA.. DDHLDVERLE GGPANRRNGS 50

B10 ..... RS G.YLR..ADT PDIK.....
GR4 ..... DR A.TFD..L-I ARYQ.....
Consensus SKKTVLTGTS KMTLTIPR.. .G...PK... ..RRFPDF DDKIISMYAR 100

B10 ..... E.....
GR4 ..... G.....
Consensus GMTVREIQGH LEELYGIDVS PDLISAVTDT VLEAV.EWQN RPLELCYPLV 150

B10 .....
GR4 .....
Consensus FFDAIRVKIR DEGF 164

```

Figura 12. Comparación entre las secuencias de ADN (A) y proteína de ISRm3 de *R. meliloti* GR4 y *R. leguminosarum* B10

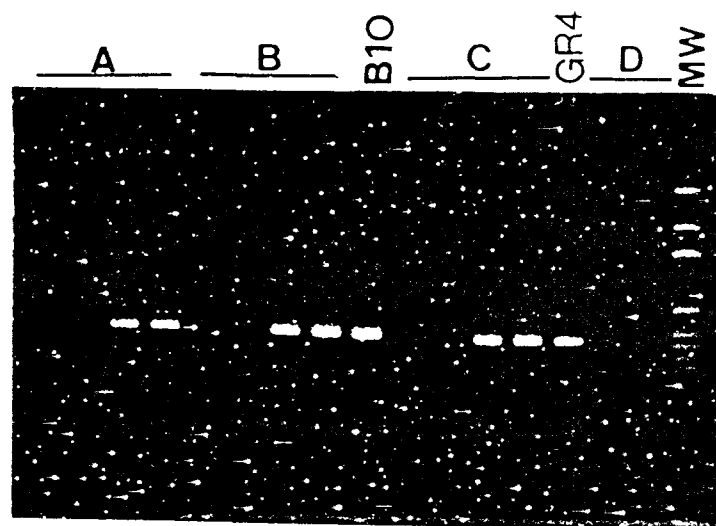


Figura 13. Amplificaciones con los cebadores R35/R32 de algunas cepas de Rothamsted (A), Erlangen(B), Dijon (C) y la EEZ(D)

4.-Identificación de secuencias de inserción homólogas a *ISRm4* de *R. meliloti* en *R. leguminosarum* bv. *viciae*

ISRm4 es un elemento de inserción de *R. meliloti* de 933 pb similar estructuralmente al elemento de inserción IS402 de *P. cepacia*. En la cepa GR4 se presenta en una única copia asociada al plásmido pRmeGR4b, sin embargo su distribución dentro de *R. meliloti* no es tan amplia como ocurre con *ISRm3* (alrededor del 60% de la población de *R. meliloti* de la EEZ). Hasta este momento se desconocía si se podían encontrar secuencias homólogas a *ISRm4* fuera de *R. meliloti*.

Se analizaron mediante hibridación de ADN con una sonda para *ISRm4* marcada con digoxigenina (fragmento interno *MluI/SphI* de *ISRm4*-Soto *et al.*, 1992b) las mismas poblaciones de *R. leguminosarum* que se mencionan en el apartado 3 de Resultados, aunque con menos representantes cada una de ellas al haber hecho una selección previa de las cepas por su capacidad de ser amplificadas con los cebadores R43/R44 específicos del elemento *ISRm4* de la cepa GR4 (Fig. 14).

Como podemos ver en la Figura 14, la población de *R. leguminosarum* procedente de la EEZ presenta un patrón de hibridación similar en las cinco cepas que hibridan de las seis cepas ensayadas. En cuanto a las otras poblaciones foráneas de *R. leguminosarum*, cuatro de los diez aislados de Rothamsted hibridan, pero sólo dos de ellos presentan el mismo patrón (FIS5 y FIS10). En los aislados de Dijon, nueve de los once aislados hibridan, pero sólo 3 repiten el patrón (SC8, SC14 y BA11). Ninguna de las cuatro muestras probadas procedentes de Erlangen, incluida la B10, hibrida con la sonda de *ISRm4*, y de las cuatro muestras de Schlüterhof ensayadas sólo dos hibridaban (F3-50 y F3-52).

4.1.-Presencia de *ISRm3* e *ISRm4* en cepas de *S. fredii*

S. fredii es una especie filogenéticamente muy relacionada con *R. meliloti*. Mediante hibridación ADN-ADN y la utilización de las parejas de cebadores específicos de *ISRm3* e *ISRm4*, se determinó que las cepas de *S. fredii* HH003 y HH102 carecen del elemento de inserción *ISRm3*. Sin

Figura 14. Hibridaciones de distintas cepas de R. leguminosarum bv. viciae y S. fredii con la sonda de ISRm4.

embargo, estas mismas cepas sí poseen elementos homólogos al *ISRM4* de *R. meliloti*.

Ambas cepas, HH003 y HH102, hibridan con unos patrones muy similares y muy complejos en cuanto al número de bandas que se detectan con la sonda de *ISRM4*, y en todos los casos estos patrones son distintos al patrón de hibridación de *R. meliloti* GR4 o de cualquier cepa de *R. leguminosarum* de las ensayadas.

Dos elementos homólogos a *ISRM4* han sido recientemente clonados y secuenciados procedentes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Mazurier *et al.*, 1996).

4.2.-Secuenciación de elementos homólogos a *ISRM4* de *R. meliloti* en *S. fredii* HH102 y diversas cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y diseño de cebadores para su reconocimiento por PCR

Se hicieron varias pruebas de amplificación por PCR de las secuencias homólogas al elemento de inserción *ISRM4* en diversas cepas y con distintas parejas de oligonucleótidos.

Así se amplificaron con parejas de cebadores diseñadas a partir de la secuencia de *ISRM4* de *R. meliloti* GR4 las cepas de *R. leguminosarum* FIS6 de Rothamsted, SA20 de Dijon (usando los cebadores R43/SR4 en ambos casos) y GRB326 (haciendo uso de los cebadores R42/RL4) procedente de nuestra propia colección de la EEZ, además de la cepa de *S. fredii* HH102 (combinando varias parejas de cebadores) (**Fig. 15**).

Se diseñaron varias parejas de cebadores al objeto de poder obtener amplificaciones de las secuencias homólogas a *ISRM4* de *R. meliloti* en todas las cepas que pretendimos secuenciar, dado que algunos de los cebadores diseñados a partir de la secuencia de *ISRM4* de *R. meliloti* GR4 no producían amplificaciones en cepas de otros *Rhizobium* distintos, probablemente por coincidir los cebadores con regiones en las que podría haber diferencias en las secuencias de nucleótidos entre estos ADN y el de GR4, con lo que no se obtenían amplificaciones por PCR o si se obtenían, éstas daban una señal muy débil.

El porcentaje de homología de los distintos amplificados con respecto a la secuencia de GR4 se recoge en la **Tabla 13**, y la comparación de las secuencias que dan más homología podemos verla en la **Figura 15**.

Tabla 13. Porcentaje de homología de fragmentos amplificados por PCR de elementos homólogos al *ISRM4* de *R. meliloti* GR4 en otras cepas de *Rhizobium* de distinto origen geográfico.

Cepa	Procedencia	Bases secuenciadas	% homología
<i>S. fredii</i> HH102	China	850 (varios cebadores)	76
<i>R. leguminosarum</i> GRB326	EEZ (Granada)	425 (R42/RL4)	<50
<i>R. leguminosarum</i> SA20	Dijon (Francia)	395 (R43/SR4)	51
<i>R. leguminosarum</i> FIS6	Rothamsted (Reino Unido)	588 (R43/SR4)	75

GR4/FIS6-ISRm4 Formatted Alignment

ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">U.A.C.C.S.....AAC.....C.....C..... 396 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">A.E.T.P.....GGT.....I.....E..... 50 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> ATGGCGAGCG ACMGFGYTRT GGRRY CGGAT CAACCA CAT CTMGT TATGG </div>	50
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> ATGGCGAGCG ACMGFGYTRT GGRRY CGGAT CAACCA CAT CTMGT TATGG </div>	50
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">A.A.G.....A.A.A.C.....C.....C.....C..... 446 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">E.E.I.....C.....A.....P.....C.S.G.....E.....E.....E..... 100 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> AGRCRCGAGA MTTGARGGW MGRSARGCCT CKCSWCAGC GGYGTGATC </div>	100
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> AGRCRCGAGA MTTGARGGW MGRSARGCCT CKCSWCAGC GGYGTGATC </div>	100
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">I.....E.....I.....C.....C.....C.....C.....C..... 496 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">C.....P.....C.....C.....S.....S.....P.....T.....C.....G.....A..... 150 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> GAMAGTCARA GGTGAAAAC CACSGAAAGC GGCGMATTY SSGGCTATGA </div>	150
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> GAMAGTCARA GGTGAAAAC CACSGAAAGC GGCGMATTY SSGGCTATGA </div>	150
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> T.....A.....C.....C.....C.....C.....C.....C..... 546 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> C.....C.....A.....E.....P.....P.....P.....P.....P..... 200 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> YCGGGMAAG AAGATMAAG GMCGCAAGCG TCATATC TC GTCGACACGC </div>	200
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> YCGGGMAAG AAGATMAAG GMCGCAAGCG TCATATC TC GTCGACACGC </div>	200
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">I.....A.....C.....C.....C.....C.....C.....C..... 596 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">C.....A.....C.....C.....C.....C.....C.....C..... 250 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> TMGGCTGAT GGTCGGCCTC ATGGTACAC GGGCGAVRT TCAGGATCGC </div>	250
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> TMGGCTGAT GGTCGGCCTC ATGGTACAC GGGCGAVRT TCAGGATCGC </div>	250
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">A.....C.....ATC.....CT.....E.....ST.....C.....GTC.....CA..... 645 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">C.....C.....I.....CCG.....TC.....C.....AA.....T.....TCA.....GC..... 300 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> GACGGVGGCG CYGMYSIVYT SAARWCCATY CKYMASMGYT GGCCITGGCT </div>	300
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> GACGGVGGCG CYGMYSIVYT SAARWCCATY CKYMASMGYT GGCCITGGCT </div>	300
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">CTT.....G.....I.....C.....C.....C.....C.....CGAA.....A.....A.....C 695 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">AGA.....P.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....ACCG.....E.....E.....G 350 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> GMKWCAITTC TTGCCGATG GTGGTAMGC SGGMSMRAAG CTGARAGCCS </div>	350
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> GMKWCAITTC TTGCCGATG GTGGTAMGC SGGMSMRAAG CTGARAGCCS </div>	350
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> G.....A.....G.....A.....GCAA.....GG.....A.....G.....C.....A.....CT..... 745 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> C.....C.....A.....E.....CTGC.....TC.....I.....C.....G.....G.....GA..... 400 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> SACTGMAFAA RATCCSYRMG TKSACACTCS ASATORTCAA GCGSWCCGAC </div>	400
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> SACTGMAFAA RATCCSYRMG TKSACACTCS ASATORTCAA GCGSWCCGAC </div>	400
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">A.....A.....CC.....I.....A.....C.....A.....C.....C.....E.....I..... 795 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">G.....G.....GC.....C.....E.....E.....E.....P.....C.....A.....E..... 450 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> AAGRCCAARG SSITMGAGRT ACTRCCSCGY CGSTGGGTWG TRGAGCGCAC </div>	450
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> AAGRCCAARG SSITMGAGRT ACTRCCSCGY CGSTGGGTWG TRGAGCGCAC </div>	450
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> A.....I.....G.....GC.....CA.....GC.....A.....C.....TC.....E.....A..... 845 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> C.....C.....I.....CA.....AC.....AT.....G.....G.....T.....EG.....A.....E..... 500 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> MTTMGCATGG CTGGGSMGAT GCCGMMGRVT GGCGAARGAV TKSGARAART </div>	500
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> MTTMGCATGG CTGGGSMGAT GCCGMMGRVT GGCGAARGAV TKSGARAART </div>	500
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">A.....I.....C.....C.....A.....A.....C.....A.....E.....C..... 895 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">G.....C.....E.....E.....E.....I.....E.....G.....C.....G..... 550 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> CCRTCGQTC AGCCSAGGCC TGRTCAQWA TCGCCACAT CCSRTICTS </div>	550
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> CCRTCGQTC AGCCSAGGCC TGRTCAQWA TCGCCACAT CCSRTICTS </div>	550
ISRm4mod (347-928)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">GA.....E.....GC.....I.....A.....T.....C..... 928 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;">AC.....A.....CT.....G.....G.....CC.....P..... 583 </div>	
SEC ISRm4 FIS6 (1-583)	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> ACRMGRCGSY TKGCAAGRTA YKGTATCGT TGA </div>	583
Consensus	<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 8px;"> ACRMGRCGSY TKGCAAGRTA YKGTATCGT TGA </div>	583

GR4/HH102-ISRm4 Formatted Alignment

ISRm4mod (32-928)TC.....C.....CC.....A.....	81
SEC ISRm4 1782 (1-895)CC.....T.....TT.....E.....	47
Consensus	AGTTGAGTGA AATCAGYSAG TTGTGATTCY GTYKCFITTTG CTTAFGATTC	50
ISRm4mod (32-928)CT.....A.....C.....G.....	131
SEC ISRm4 1782 (1-895)A.....GC.....I.....G.....C.....	97
Consensus	GAAMGGAGAC CACFATGGSY TGGACTGATT TCACCCGACS GCAATATGCS	100
ISRm4mod (32-928)BC.....T.....A.....T.....T.....CT.....	181
SEC ISRm4 1782 (1-895)AA.....G.....C.....A.....A.....GGA.....	147
Consensus	CGACGSGCRM KCGFATATGC AAGGATCTK ACGGACCGG ARTGCKSWIT	150
ISRm4mod (32-928)S.....CC.....CG.....C.....C.....A.....AG.....	231
SEC ISRm4 1782 (1-895)T.....T.....TG.....GA.....G.....G.....GC.....	197
Consensus	RATCCGCKK IYQVTCGYS SFCGCGKCG GTRGGCAGR CCGCGCARSA	200
ISRm4mod (32-928)I.....C.....C.....C.....GT.....C.....T.....	281
SEC ISRm4 1782 (1-895)C.....C.....C.....C.....CA.....C.....G.....	247
Consensus	CCGATMTCG NGAGGTSGTG AAGCGTTGC TTTACATCGC SWCGAGSGCK	250
ISRm4mod (32-928)C.....C.....C.....C.....T.....C.....T.....C.....	331
SEC ISRm4 1782 (1-895)A.....I.....T.....A.....A.....A.....	297
Consensus	TGCCATGGC GGATGTCG SAAGGATTY CCGCAATTW CMACTGTCCA	300
ISRm4mod (32-928)C.....A.....C.....E.....AAC.....	381
SEC ISRm4 1782 (1-895)TG.....A.....G.....I.....P.....GGT.....	347
Consensus	GKSCATTTC TACGAATGC GAGCGAOMR GMTITGRRY CCGATCAACC	350
ISRm4mod (32-928)C.....A.....A.....S.....C.....AA.....AC.....E.....I.....C.....	431
SEC ISRm4 1782 (1-895)I.....G.....G.....C.....C.....A.....CC.....GG.....A.....G.....A.....	397
Consensus	AMCATCTGT SATGGAGTGR CGGAATTGG AFGGMRSA RGCCTCKCCM	400
ISRm4mod (32-928)C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	481
SEC ISRm4 1782 (1-895)I.....C.....C.....A.....C.....G.....G.....G.....	447
Consensus	WCGCGGCG TGATGAGAG TCARAGTGE AAAACCACG AAAGCGGCGG	450
ISRm4mod (32-928)CG.....I.....I.....A.....C.....C.....C.....	531
SEC ISRm4 1782 (1-895)TC.....A.....C.....C.....E.....A.....G.....	497
Consensus	MATTYSSGCC TITGAGGCGG MAAGAAGAT CAAGGMCGS AAGCGTCATA	500
ISRm4mod (32-928)C.....C.....G.....C.....I.....G.....E.....T.....	581
SEC ISRm4 1782 (1-895)G.....C.....G.....T.....G.....G.....I.....A.....C.....C.....	547
Consensus	TCTCGTGCA CAGCTTGGG YTGATGGTCG GCCTCAKGGT KCACGSGGY	550
ISRm4mod (32-928)CC.....I.....G.....A.....G.....C.....AT.....C.....G.....ST.....C.....GT.....	631
SEC ISRm4 1782 (1-895)TA.....C.....A.....C.....A.....I.....CC.....G.....C.....C.....AA.....I.....CCA.....	597
Consensus	GAVRIMCARG ATCGCGACGG VGCRCVGM YSTOMTSAAW CCATVCSYMA	600
ISRm4mod (32-928)	CA.....A.....CTT.....C.....I.....I.....C.....S.....S.....CG.....	680
SEC ISRm4 1782 (1-895)	GC.....C.....AGA.....A.....C.....C.....T.....I.....C.....AC.....	647
Consensus	SMGATGGCCG TGGCTGMKVC ATRTCTTGC CGAMGGTGGY TAMGCGGMS	650
ISRm4mod (32-928)	AA.....A.....CG.....S.....A.....S.....P.....GCAAG.....CG.....A.....S.....D.....	730
SEC ISRm4 1782 (1-895)	CG.....C.....G.....GC.....C.....C.....A.....E.....CTGCC.....TC.....I.....C.....E.....	697
Consensus	MFAAGCTGAA GFGCSACTS MARAAATCG SYRMSKXKAC VCTCSASATC	700
ISRm4mod (32-928)	A.....CT.....A.....A.....CG.....T.....BA.....C.....P.....C.....C.....E.....	780
SEC ISRm4 1782 (1-895)	G.....GA.....G.....G.....GC.....C.....AG.....T.....S.....E.....S.....E.....	747
Consensus	RTCAAGCGSW CCGACAAGTC CAAGSSTTY GARRTYCTTC CFCGSCGKGTG	750

GR4/HH102-ISRM4 Formatted Alignment

ISRM4mod (32-928)A.....I.....S.....GC.....C A..GC.....S.	830
SEC ISRM4 1782 (1-895)C.....C.....I.....CA.....A C..AT.....I.	797
Consensus	GGTGTGGAG CGCACMTTG CATGGCTGG SNGATGCCM MRYTGGCKA	800
ISRM4mod (32-928)	..A..C..TC.....A.....I.....C.....C.....A.....	880
SEC ISRM4 1782 (1-895)	..G..T..GG.....G.....A.....G.....I.....I.....	847
Consensus	ARGAMTKSGA GAATTCATC GATCAGCCS AGGCTGGAT CACATCGCC	850
ISRM4mod (32-928)CA.....S.....GA.....GC.....A.....TI.....C.....	928
SEC ISRM4 1782 (1-895)GG.....C.....AC.....A.....CT.....S.....G.....CG.....A.....I.....	895
Consensus	CACATCCGSR TCTTACRMG SCGSYTKGCA AGTAYKMT ATMGTTGA	898

Figura 15. Comparación de las secuencias de nucleótidos de ISRm4 de R. meliloti con el de R. leguminosarum FIS6 y S. fredii HH102.

Las homologías a nivel de secuencia de proteínas deducida a partir de las secuencias de nucleótidos de los elementos homólogos a *ISRm4* de las cepas *R. leguminosarum* FIS6 y *S. fredii* HH102, que son las más homólogas, puede verse en la **Figura 16** y la **Tabla 14**.

5.-Detección de transferencia génica desde la microflora del suelo a la cepa liberada *S. fredii* HH102

Para el estudio de la posible transferencia de material genético desde la microflora del suelo a una cepa liberada elegimos la cepa *S. fredii* HH102. La EEZ carece de una población autóctona que nodule soja, y además *S. fredii* es una especie muy próxima evolutivamente a *R. meliloti*, especie esta última que consideramos como donadora de los marcadores genéticos elegidos para efectuar su seguimiento. Finalmente, aunque la cepa HH102 tiene elementos homólogos a *ISRm4*, carece del elemento *ISRm3* (**Fig. 17**).

S. fredii HH102 se puede seleccionar en primera instancia por su capacidad para nodular soja y posteriormente por su resistencia espontánea a los antibióticos estreptomicina y gentamicina (**Fig. 18**). La presencia del elemento *ISRm4* en la cepa HH102 sirve como control positivo del funcionamiento de los lisados procedentes de nódulos de soja ocupados por *S. fredii* y recogidos según se especifica en el correspondiente apartado de **materiales y métodos**.

5.1.-Análisis preliminares de nódulos de soja

El análisis de un elevado número de nódulos de soja nos planteó el problema de la conservación de los mismos para su posterior análisis y el mantenimiento de su viabilidad dada la imposibilidad de efectuar el análisis de los nódulos de forma simultánea a su recolección. Así, a lo largo del trabajo desarrollado con los nódulos de soja se ha podido observar que prácticamente el 100% de los nódulos que se trituran y se siembran sobre placas de TY con o sin los antibióticos Sm y Gm, crecen si estos nódulos son frescos o se han mantenido congelados en seco y sólo se han descongelado una vez para plaquearlos el mismo día de la descongelación. Sin embargo, si los nódulos se congelan y posteriormente permanecen descongelados más de un día, aunque se conserven en frío, la viabilidad decae dramáticamente, pudiendo extraerse células de *Rhizobium*, tras un sólo día de descongelación, únicamente del 35 al

Untitled-6 Formatted Alignment

Prot.ISRm4mod (104-186)	..I..E...Q	..I.....	..S..F.....N.....I..	153
Prot. fis6 (1-83)	..P..E	..S.....	..S..M.....K.....V..	50
Consensus	ME.R.LEGR.	ASF.AGVIDS OSVKTTESGG I.G.DAGKKI	GRKRHI.VD	50
Prot.ISRm4mod (104-186)S..M.....DL..S..RH...S..I.....AV..I..LK...		186
Prot. fis6 (1-83)S..I.....AV..I..LK...			83
Consensus	TLGLMVGLMV H.AD.ODRDG AE..LK..I..RWP			83

Untitled-6 Formatted Alignment

Prot.ISRm4mod (5-186) 54
 Prot. 1782 (1-182) 50
 Consensus 50

```

    A . . . . . S . . . . . R . . . . . F . . . . . M . . . . .
    C . . . . . R . . . . . R . . . . . S . . . . . C . . . . . S . . . . .
    M W T D F T R Q Y A R R A R Y A S D L T D R E W L I E P P R R L G R P R T D R E
    
```

Prot.ISRm4mod (5-186) 104
 Prot. 1782 (1-182) 100
 Consensus 100

```

    . . . . . S . . . . . S . . . . . G . . . . . E . . . . . N . . . . .
    . . . . . T . . . . . V . . . . . T . . . . . S . . . . . C . . . . .
    V V N A L L Y I A T G C O W R M P K D F P P T V Q Y F Y E W R A T L W R I N H H L V M
    
```

Prot.ISRm4mod (5-186) 154
 Prot. 1782 (1-182) 150
 Consensus 150

```

    I . . . . . Q . . . . . I . . . . . R . . . . . F . . . . . N . . . . .
    A . . . . . E . . . . . S . . . . . S . . . . . Y . . . . . K . . . . .
    E R E L E G R A S P A G V I D S Q S V K T T E S G G I G D A G K K I G R K R H I V D T
    
```

Prot.ISRm4mod (5-186) 186
 Prot. 1782 (1-182) 182
 Consensus 182

```

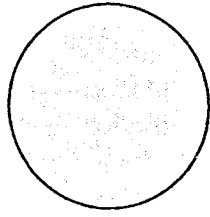
    . . . . . M . . . . . S . . . . . D L . . . . . S . . . . . R H . . . . .
    . . . . . R . . . . . S . . . . . T . . . . . A V . . . . . I . . . . . P K . . . . .
    E G L M V G L V H A D Q D R D G A P L K I R W P
    
```

Figura 16. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de ISRm4 de *R. meliloti* GR4 con los de *R. leguminosarum* FIS6 y *S. fredii* HH102.

Tabla 14: Porcentaje de homología a nivel de secuencia de aminoácidos de la posible transposasa de distintos elementos homólogos al *ISRm4* de *R. meliloti* en *R. leguminosarum* y *S. fredii*.

Cepa	Aminoácidos	% homología
<i>R.leguminosarum</i> FIS6	83	82
<i>S. fredii</i> HH102	182	83

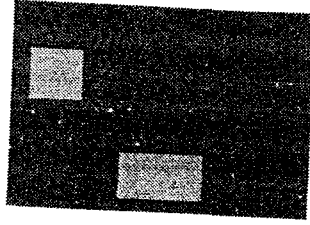
Figura 17. Protocolo de detección de transferencia génica del suelo a *S. fredii* HH102 (Sm^R Gm^R)



S. fredii HH102

ISRm6⁻

ISRm3⁻



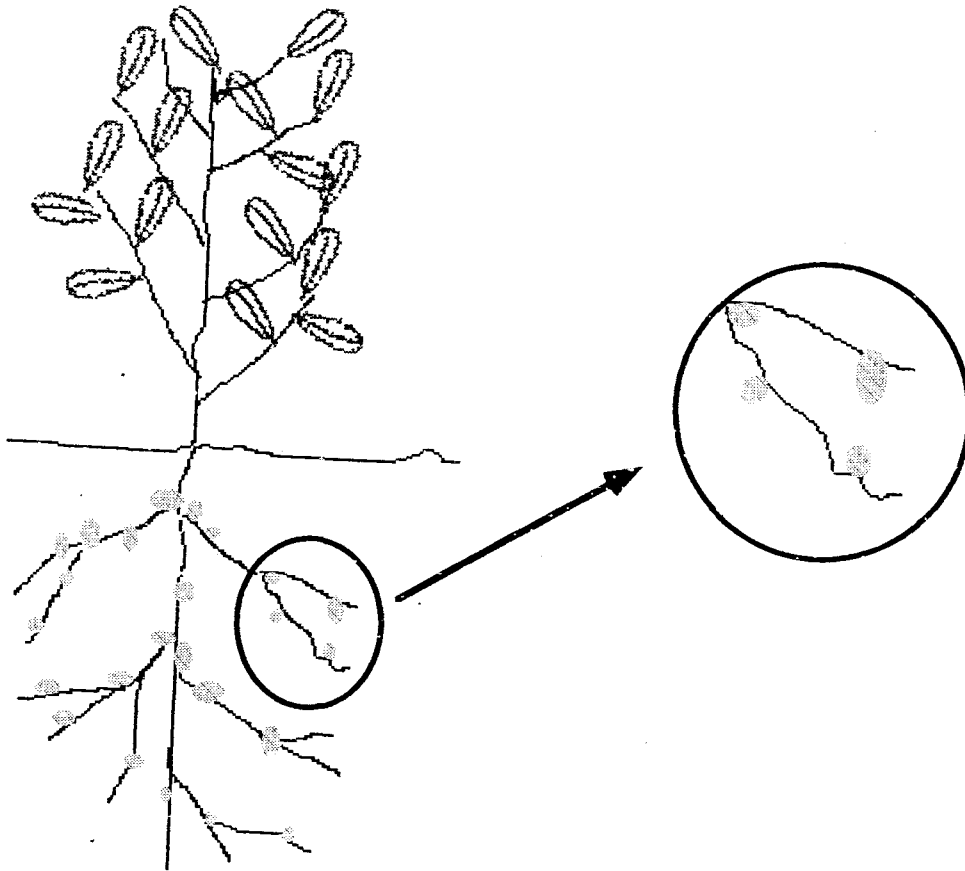
Suelo EEZ

S. fredii⁻

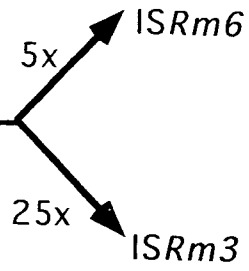
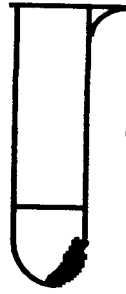
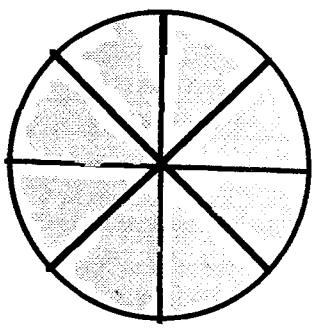
ISRm6⁺ (100%)

ISRm3⁺ (80-90%)

Análisis de elementos génicos presentes en la flora nativa y ausentes en *S. fredii* HH102 (Sm , Gm)^R que podrían ser adquiridos por ésta.



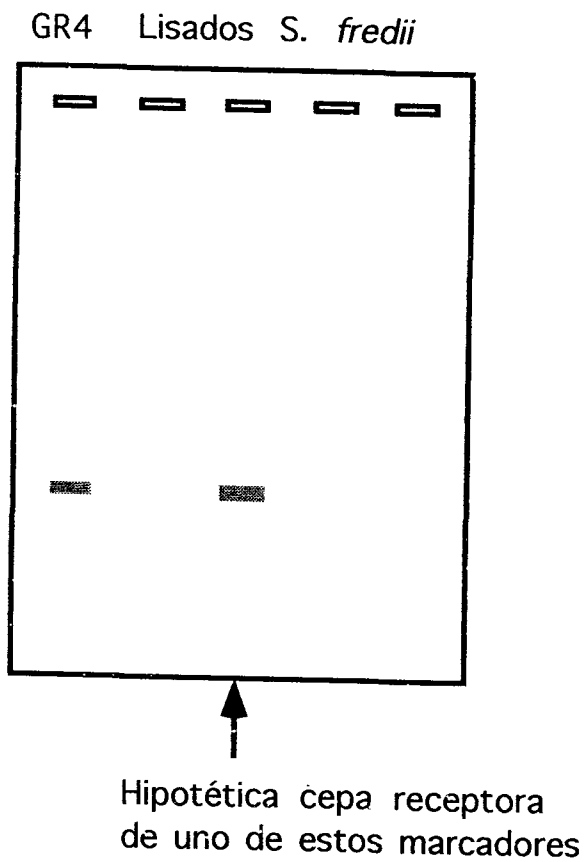
beración de *S. fredii* en semillas de soja y recogida de nódulos para su análisis



TY + Sm + Grm

Lisis de los nódulos para la obtención de la cepa liberada

Lisis de las colonias para la realización de las pruebas de PCR



Electroforesis de las amplificaciones de los lisados por PCR

Figura 18. Análisis de lisados procedentes de nódulos de soja

40% de los nódulos, y tras varios días de descongelación se llega a perder totalmente la viabilidad de las células que forman el nódulo.

En un primer momento analizamos unos 20.000 nódulos de soja ocupados por la cepa *S. fredii* HH102 procedentes del CIDA en Las Torres (Sevilla) para la presencia de los elementos *ISRM3* e *ISRM4*, haciendo uso de las parejas de cebadores R35/R32 y R43/R44, respectivamente. Este mismo análisis se llevó a cabo para *ISRM6*, con la pareja de cebadores R61/R62, recientemente identificado en nuestro grupo. *R. meliloti* GR4 tiene dos copias de *ISRM6*, este se encuentra en el 100% de la población de *R. meliloti* de la EEZ (Zekrí & Toro, 1996) y está ausente en la cepa original de *S. fredii* HH102.

Los PCRs llevados a cabo con los correspondientes lisados fueron positivos para la presencia de *ISRM4* y negativos para la presencia de los otros dos elementos de inserción ensayados, *ISRM3* e *ISRM6*. En este primer análisis inicial la lisis y plaqueo de nódulos de soja en medio TY se hizo de paquetes de aproximadamente 200 nódulos tras comprobar que en mezclas de células positivas/negativas para el PCR con una determinada pareja de oligonucleótidos en distintas proporciones y posterior lisis de la mezcla, eramos capaces de detectar una célula positiva en más de 200 negativas (Fig. 19). Suponíamos así que las células mezcladas tenían curvas de crecimiento similares y estarían proporcionalmente representadas en la muestra sometida a lisis para el análisis de PCR.

5.2.-Liberación de *S. fredii* HH102 y análisis de nódulos procedentes de la EEZ

La inoculación de *S. fredii* HH102 en la EEZ se hizo impregnando semillas de soja con aproximadamente 10^{11} células de esta cepa y sembrando posteriormente estas semillas en unas parcelas perfectamente acotadas a finales de junio de 1994. También mantuvimos una parcela con soja sin inocular al objeto de confirmar que la nodulación de esta planta no se producía en este suelo control por carecer el mismo de cepas de *Rhizobium* nodulantes de esta planta. Una vez inoculado el suelo de la EEZ con *S. fredii* HH102 a través de la siembra de semillas de soja, volvimos a sembrar con soja sin inóculo al año siguiente, y tras dejar nodular las plantas, recogimos alrededor de 6.000 nódulos de soja en agosto de 1995 para someterlos al análisis por PCR para la presencia de los dos elementos de inserción de los que carecía la cepa HH102 originalmente, *ISRM3* e

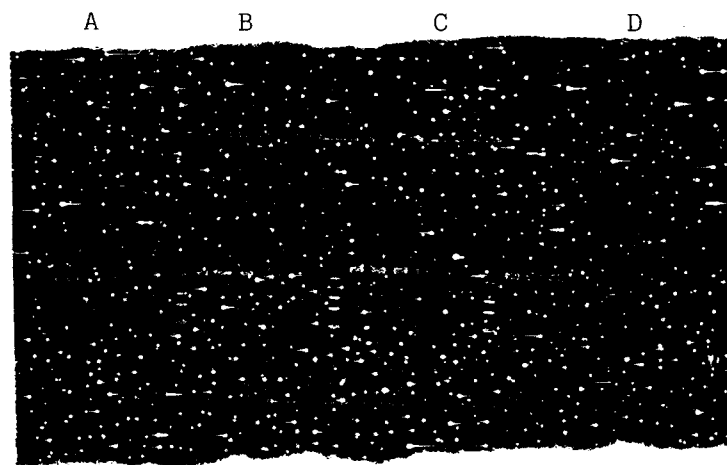


Figura 19. Amplificaciones de PCR de lisados o mezclas de ADN con distintas parejas de oligonucleótidos.
A: mezcla 1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 0 de GR4/HH102 para R61/R62
B: lo mismo pero con ADN purificado
C: mezclas de lisados para R43/R44
D: mezclas de lisados 1, 1/100, 1/200, 1/2000, 1/20000 y 0 para los oligonucleótidos R35/R32.

ISRm6. La existencia de cualquier forma de transferencia génica desde la microflora del suelo a la cepa liberada HH102 que incluyese a alguno de estos elementos, provocaría en la cepa modificada naturalmente la aparición de señales positivas al realizarle los correspondientes análisis de PCR. Sin embargo, en este ensayo tampoco se obtuvo resultado positivo que indicase la presencia de ISRm3 o de ISRm6 en *S. fredii* HH102 como consecuencia de esa posible transferencia génica.

El análisis de estos 6.000 nódulos (**Fig. 18 y 19**) se hizo en este caso siguiendo una metodología diferente al análisis previo llevado a cabo sobre los 20.000 nódulos procedentes del CIDA (Las Torres-Sevilla) mezclando lisados en grupos de 5 cuando se amplificaba con R61/R62 y en grupos de 25 lisados cuando los cebadores que utilizamos eran R35/R32.

Previamente habíamos comprobado que estos cebadores funcionaban correctamente en mezclas de lisados de cepas muy superiores a las empleadas aquí, en las que sóloamente el lisado de una cepa que era positiva, *R. meliloti* GR4, se mezclaba con diverso número de cepas negativas para la pareja de cebadores ensayadas. En el caso de utilizar la pareja de cebadores R61/R62, conseguíamos buenas amplificaciones en mezclas de lisados de hasta 1:20 (**Fig. 18 y 19**) en lisados de cepas positivas (GR4):lisados de cepas negativas; y con la pareja de cebadores R35/R32 llegamos, al menos, a una relación 1:50 (**Fig. 18 y 19**) que fue la más baja de las ensayadas, con lo que el margen de detección en el que nos movemos al realizar los ensayos es suficientemente amplio.

DISCUSSION GENERAL

La inoculación de campos de cultivo de leguminosas con especies seleccionadas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es una práctica agrícola muy común en todo el mundo desde hace más de un siglo con objeto de incrementar el rendimiento de estos cultivos. El éxito de cualquier tipo de inoculación se ve limitado por el hecho de que la flora nativa del suelo normalmente compite con las cepas introducidas por la formación de nódulos y la colonización de las raíces, esta situación se conoce como el "problema de la competitividad" (Boonker *et al.*, 1978; Noel & Brill, 1980; Kamicker & Brill, 1986; Beattie *et al.*, 1989; Triplett, 1990; Toro *et al.*, 1992; Olivares *et al.*, 1993; Toro, 1996).

Diversos estudios realizados llaman la atención sobre la dificultad que entraña el remplazar cualquier población nativa de un suelo con cepas no autóctonas procedentes de inoculaciones. Se han empleado inoculaciones masivas, agentes bactericidas en combinación con cepas resistentes a ellos, diversas composiciones de inóculos y distintas formas de inoculación de cultivos, así como genotipos de plantas huésped y cepas bacterianas seleccionados con objeto de controlar las infecciones en el campo. Es bien conocido que cepas seleccionadas como altamente competitivas y eficientes bajo condiciones controladas, ya sea en trabajos de laboratorio o en trabajos de invernadero, no siempre se comportan de la misma manera una vez liberadas en el campo. En cualquier caso, la diversidad genotípica y fenotípica de las cepas de *Rhizobium* es una base fundamental a la hora de la selección de posibles cepas inoculantes por sus características simbióticas y ecológicas (Thompson, 1988; Catroux & Amarger, 1992).

A la hora de abordar cualquier tipo de liberación de microorganismos al medio ambiente ya sea con cepas nativas o como microorganismos modificados genéticamente (MMGs) hay que tener en

cuenta varias cuestiones que suscitan polémica no sólo en la opinión pública, sino también entre los propios investigadores especializados en el tema.

Por un lado debemos conocer la estructura genética de las poblaciones nativas del suelo en el que se van a efectuar estas liberaciones, así como conocer la dinámica de la población para poder determinar las posibles alteraciones como consecuencia de la introducción de cepas con capacidad potencial para modificar la dinámica de ese suelo.

La cepa de *R. meliloti* GR4 es una cepa altamente infectiva y competitiva en la formación de nódulos en raíces de alfalfa. Esta cepa, además de los megaplásmidos simbióticos (pSym), lleva otros dos plásmidos conocidos como pRmeGR4a y pRmeGR4b. Diversos estudios han llegado a la conclusión de que la capacidad competitiva de esta cepa se halla estrechamente ligada a una región de ADN denominada *nfe* (nodule formation efficiency genes) (Toro & Olivares, 1986; Sanjuan & Olivares, 1989; Soto *et al.*, 1993) localizada en el plásmido pRmeGR4b. En las proximidades de la región *nfe* se han encontrado al menos dos secuencias de inserción *ISRM3* (Soto *et al.*, 1992a) e *ISRM4* (Soto *et al.*, 1992b) que aparecen como copias únicas en el genoma de GR4. Aunque recientemente en nuestro laboratorio se ha identificado una nueva copia de *ISRM4* con otro elemento de inserción integrado en el mismo (Zekrí & Toro, no publicado). El plásmido pRmeGR4a, hasta ahora, no ha podido asociarse ni con la supervivencia ni con la capacidad simbiótica de la cepa GR4; pRmeGR4a, sin embargo, es un plásmido autotransmisible y la región de su origen de replicación ha sido clonada y secuenciada. En esta región se ha detectado una posible secuencia codificante que presenta homología con la proteína RepC de *A. tumefaciens* (Mercado-Blanco & Olivares, 1993 y 1994).

Debido a la gran cantidad de beneficios potenciales que podría reportar el uso de GR4 como inoculante en cultivos de alfalfa, es necesario tener una información suficientemente detallada sobre la frecuencia de este tipo de cepas y/o sobre la presencia del plásmido pRmeGR4b en las poblaciones nativas del suelo.

Mediante técnicas de PCR, caracterizamos la población nativa de *R. meliloti* presente en la actualidad en el suelo de la EEZ de donde se aisló originalmente la cepa GR4 en 1975. Además estudiamos la presencia de plásmidos tipo pRmeGR4b en otras cuatro poblaciones distintas de *R. meliloti*. También observamos el efecto que ejerce la planta huésped sobre

la frecuencia de este tipo de plásmido en la correspondiente población infectiva.

Pudimos comprobar que la presencia de plásmidos del tipo pRmeGR4b en la población infectiva parece estar íntimamente ligada a *M. sativa* (alfalfa) como planta huésped. En general, estas cepas constituyen un importante porcentaje de la población infectiva de *R. meliloti* nodulante de *M. sativa* en todos los suelos estudiados (Tabla 8). En otras plantas huésped, como son *M. alba* y *M. sphaerocarpa*, el porcentaje de cepas aisladas de nódulos con este tipo de plásmidos decae dramáticamente.

Así parece como si el empleo de *M. sativa* como planta huésped en suelos de España hiciese una selección de las cepas de *R. meliloti* que llevan preferencialmente plásmidos del tipo pRmeGR4b. En cualquier caso, las cepas que contienen plásmidos del tipo pRmeGR4b parecen ser más competitivas a la hora de nodular alfalfa que abundantes en los distintos suelos estudiados, ya que, por la técnica del Número Más Probable (MPN), encontramos que las cepas que llevan este tipo de plásmidos constituyen un importante porcentaje de entre las que nodulan alfalfa con diluciones muy bajas de suelo, mientras que cuando las diluciones de suelo son muy altas, este tipo de cepas puede llegar a ser indetectable. Llama la atención, sin embargo, el hecho de que el empleo de cultivos de alfalfa no cause un enriquecimiento progresivo del porcentaje de cepas infectivas con el plásmido pRmeGR4b, quizás porque a estos niveles la población se encuentra saturada y perfectamente estabilizada.

El agrupamiento de aislados de la EEZ obtenido mediante "ERIC-" e "IS-fingerprint" parece ser el mismo, este agrupamiento también lo podemos comparar con el obtenido mediante PCR basado en secuencias específicas de ADN. La similitud en los agrupamientos de cepas basados en estas tres técnicas parece indicar que la presencia del plásmido pRmeGR4b, al menos en la EEZ, está asociado a cepas genéticamente muy similares.

También hemos intentado averiguar de qué manera puede afectar la introducción de una cepa nativa en el mismo suelo del que se aisló a la infectividad del resto de cepas presentes en ese mismo suelo. Así, liberamos en 1993 la cepa *R. meliloti* GR4 en el mismo suelo de donde fue aislada en 1975. La evolución de la población fue analizada durante los dos años siguientes a la liberación. No pudimos observar ninguna alteración significativa de la población nativa de *R. meliloti* al cabo de

este tiempo. Nuestros resultados coinciden plenamente con lo sugerido en 1995 por De Leij *et al.*, para ellos, es posible que la liberación de cepas en un suelo cause ligeras pero a la vez modificaciones transitorias de la estructura genética de una población determinada durante un corto periodo de tiempo tras haberse llevado a cabo la liberación. Aunque nosotros en nuestros estudios no hemos utilizado ninguna cepa modificada genéticamente, en principio, no hay ninguna razón para suponer que cepas modificadas genéticamente puedan influir de forma distinta sobre la dinámica de la población establecida en un suelo que cepas no modificadas.

Todos los intentos para predecir las consecuencias de la liberación de microorganismos modificados genéticamente se complican por la posibilidad de que existan intercambios genéticos entre el microorganismo liberado y la población nativa que puedan generar nuevas combinaciones genéticas. Se ha desarrollado y sigue desarrollandose en la actualidad un gran esfuerzo investigador dirigido a la construcción de MMGs que tengan suprimida su capacidad potencial de actuar como donadores de material genético. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que estos MMGs actúen como receptores de información genética procedente del suelo, lo que podría alterar considerablemente y de forma no deseada las características originales de estos microorganismos, confiriendoles, por ejemplo, patogenicidad o capacidad de adaptación a las condiciones medioambientales locales. Uno de los principales objetivos de este trabajo era el diseño de un sistema de detección de posibles transferencias de información genética desde la microflora del suelo a las cepas introducidas.

La utilización de cepas fácilmente identificables o de técnicas que permitan esa identificación de entre el total de cepas que componen la población de un suelo es también una premisa de obligado cumplimiento a la hora de plantear una liberación en campo.

En la evaluación del impacto que sobre la población nativa del suelo podría ejercer la liberación deliberada de una cepa utilizamos un mutante espontáneo derivado de *R. meliloti* GR4, mientras que para el estudio de posibles transferencias de información genética entre la microflora del suelo y la cepa introducida empleamos la cepa foránea *S. fredii* HH102. Ambas cepas cumplen la condición de ser fácilmente identificables de entre el resto de cepas del suelo por poseer resistencia a distintos antibióticos, estreptomina y espectinomicina en el caso de GR4SS y estreptomina y gentamicina en el caso de HH102. Además, y esta es una

razón que hace a esta última especialmente atractiva, la cepa de *S. fredii* HH102 es una cepa muy relacionada con *R. meliloti* pero que, sin embargo, una vez liberada tiene la capacidad de ocupar el 100% de los nódulos de soja al no existir en nuestro suelo cepas nativas nodulantes de esta leguminosa. Además la cepa HH102 carece de determinadas secuencias de inserción que están presentes en la práctica totalidad de la población de *R. meliloti* del suelo de la EEZ. Estas son las secuencias de inserción *ISRm3* e *ISRm6* que podemos utilizar como marcadores de transferencia, mientras que la secuencia *ISRm4*, que sí posee HH102, puede ser utilizada como control de funcionamiento de los lisados de nódulos.

Como se ha dicho elegimos las secuencias de inserción (ISs) como marcadores genéticos para la identificación de posibles transferencias génicas. Estas ISs se definen como pequeñas entidades genéticas móviles que, a diferencia de lo que ocurre con los transposones que llevan resistencia a drogas, no contienen marcadores selectivos (Campbell *et al.*, 1977). Recientemente (Deng *et al.*, 1995) se ha sugerido que los elementos de inserción *IS1312* e *IS1313* de *A. tumefaciens* podrían ser el resultado de una transferencia génica horizontal de *ISRm1* e *ISRm2* de *R. meliloti*, respectivamente.

El elemento *ISRm3* de *R. meliloti* (Wheatcroft & Laberge, 1991; Soto *et al.*, 1992) se situaría dentro de una clase de ISs relacionados que incluyen *IS256* de *Staphylococcus aureus* (Byrne *et al.*, 1989) e *IST2* de *Thiobacillus ferrooxidans* (Yates *et al.*, 1988). *ISRm3* está ampliamente distribuido y conservado dentro de diferentes aislados de *R. meliloti* procedentes de distintas zonas geográficas (Wheatcroft & Laberge, 1991). Además también se había localizado, por hibridación ADN-ADN, en una cepa de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y en dos cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Wheatcroft & Laberge, 1991). Sin embargo, la distribución en otras poblaciones nativas de *Rhizobium* aún no se había estudiado. En este trabajo se ha podido determinar que elementos homólogos a *ISRm3* están ampliamente distribuidos en distintas poblaciones nativas de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, sin embargo, no se detectaron elementos homólogos en las distintas cepas de *S. fredii* estudiadas.

El diseño de cebadores específicos para el reconocimiento de *ISRm3* e *ISRm6*, mediante técnicas de PCR, permite utilizar estos elementos como marcadores genéticos en la adquisición de genes desde la población nativa de *R. meliloti* a la cepa liberada *S. fredii* HH102.

La secuencia *ISRm4* de *R. meliloti* GR4 (Soto *et al.*, 1992b) es una secuencia estructuralmente similar al elemento de inserción IS402 de *P. cepacia* (Ferrante & Lessie, 1991). En principio, la presencia de elementos homólogos a *ISRm4* en *S. fredii* sugiere la posibilidad de transferencia interespecífica con poblaciones nativas de *R. meliloti*.

Nuestros datos indican que existe una relación mucho más estrecha, basándonos en las secuencias obtenidas de los distintos *ISRm4*, entre *R. meliloti* GR4 y *S. fredii* HH102 que entre éstas y cualquiera de las cepas de *R. leguminosarum* que fueron ensayadas.

Todo ello, al igual que ocurre con la presencia de secuencias homólogas a la del elemento *ISRm3*, nos induce a pensar que su amplia distribución dentro de las distintas poblaciones nativas de estas especies bacterianas podrían ser el resultado de la transferencia horizontal de información genética. El diseño de cebadores específicos en base a la secuencia de *ISRm4* de *R. meliloti* puede servir para localizar secuencias homólogas a ésta en otras especies distintas de *R. meliloti*, siendo útiles en estudios de transferencia genética.

El hecho de que hasta el momento y con el número de nódulos de *S. fredii* HH102 que hemos analizado no se haya detectado ninguna adquisición de estos marcadores por parte de HH102 desde la microflora rizobiana del suelo, puede ser debido a la baja frecuencia de transferencia de información genética que se supone ocurre en la naturaleza y tal vez sea necesario el análisis de un mayor número de nódulos para poder detectar tal tipo de sucesos de transferencia en ensayos a más largo plazo.

CONCLUSIONES

1.-La presencia de plásmidos del tipo pRmeGR4b parece estar íntimamente ligada a la capacidad competitiva de *R. meliloti* en la nodulación de alfalfa.

2.-La estructura genética de las poblaciones de campo de *R. meliloti* determinada usando cualquiera de las tres metodologías empleadas: PCR basado en secuencias específicas de ADN; "ERIC-fingerprint" e "IS-fingerprint" es similar.

3.-La liberación de una cepa nativa de *R. meliloti* en el mismo suelo del que se aisló originalmente no causó alteraciones significativas en la estructura genética de la población nativa de *R. meliloti* de ese suelo.

4.-Secuencias de inserción de *R. meliloti* tales como *ISRm3* e *ISRm4* se pueden encontrar, además, en otras especies de *Rhizobium* ampliamente distribuidas en distintas poblaciones distantes geográficamente.

5.-Los elementos de inserción pueden ser candidatos ideales a la hora de evaluar sucesos de transferencia génica horizontal en las poblaciones nativas de *Rhizobium*.

BIBLIOGRAFIA

Aardema, B.W., Lorenz, M.G. & Krumbein, W.E. 1983. Protection of sediment-absorbed transforming DNA against enzymic inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 417-420.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Amann, R.L., Krumholz, L. & Stahl, D.A. 1990. Fluorescentoligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**: 672-770.

Amarger, N. 1974. Aspect microbiologique de la culture féverole en France. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* **60**: 105-112.

Amarger, N. 1980. Aspect microbiologique de la culture des légumineuses. *Le Sélectionneur Français* **28**: 61-66.

Amarger, N. 1981. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* **13**: 475-480.

Ames, P. & Bergman, K. 1981. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **148**: 728-729.

Amin-Hanjani, S., Meikle, A., Glover, L.A., Prosser, J.I. & Killham, K. 1993. Plasmid and chromosomally encoded luminescence marker systems for detection of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Mol. Ecol.* **2**: 47-54.

Araujo, R.S. & Handelsman, J. 1989. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* mutants with altered cell surface characteristics. (Abstr.). En: *Proc. North Am. Symbiotic Nitrogen Fixation Conf.*, 12th; Iowa State Uni., p. 72.

Armstrong, J.L., Wood, N.D. & Porteous, L.A. 1990. Transconjugation between bacteria in the digestive tract of the cutworm *Peridroma saucia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1492-1493.

Arnold, W. & Pühler, A. 1988. A family of high-copy-number plasmid vectors with single end-label sites for rapid nucleotide sequencing. *Gene* **70**: 171-179.

Austin, H.K., Hartel, P.G. & Coleman, D.C. 1990. Effect of genetically-altered *Pseudomonas solanacearum* on predatory protozoa. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 115-117.

Bakhuzien, R. 1988. The plant cytoskeleton in the *Rhizobium*-legume symbiosis. PH. D. Thesis, University of Leiden, The Netherlands.

Bale, M.J., Fry, J.C. & Day, M.J. 1987. Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3099-3107.

Barber, L.E. 1982. *Rhizobium meliloti* distribution in the soil following alfalfa inoculation. *Plant and Soil* **64**: 363-368.

Barbour, W.M. & Elkan, G.H. 1990. Physiological characteristics and competitive ability of plasmid-cured derivatives of *Rhizobium fredii* USDA 206. *Arch. Microbiol.* **154**: 1-4.

- Barran, L.R., Bromfield, E.S.P., Laberge, S. & Wheatcroft, R. 1994. Insertion sequence (IS) hybridization support classification of *Rhizobium meliloti* by phage typing. *Mol. Ecol.* **3**: 267-270.
- Bazin, M.J. & Lynch, J.M. (eds.). 1994. Environmental gene release. Models, experiments and risk assessment. Chapman & Hall. London.
- Beattie, G.A., Clayton, M.K. & Handelsman, J. 1989. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2755-2761.
- Beck, D.P. & Munns, D.N. 1985. Effects of calcium on the phosphorus nutrition of *Rhizobium meliloti*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **49**: 334-337.
- Bej, A.K., Perlin, M.H. & Atlas, R.M. 1988. Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2472-2477.
- Bentjen, S.A., Fredrickson, J.K., Van Voris, P. & Li, S.W. 1989. Intact soil microcosms for evaluating the fate and ecological impact of the release of genetically engineered microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 198-202.
- Berg, D.E. & Howe, M.M. (eds.). 1989. Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Beringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
- Beringer, J.E. & Bale, M.J. 1988. The survival and persistence of genetically-engineered micro-organisms. En: The release of genetically-engineered micro-organisms. M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner & D.E. Stewart-Tull (eds.). Academic Press, Ltd, London. pp. 29-46.
- Bhagwat, A.A., Tully, R.E. & Keister, D.L. 1991. Isolation and characterization of a competition-defective *Bradyrhizobium japonicum* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3496-3501.
- Binns, A.N., Sciaky, D. & Wood, H.N. 1982. Variation in hormone autonomy and regenerative potential of cells transformed by strain A66 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* **31**: 605-612.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1524.
- Bishop, M.J. & Rawlings, C.J. (eds.). 1987. Nucleic acid and protein sequence analysis. A practical approach. Practical approach series. IRL Press Limited.
- Bolton Jr., H., Fredericson, J.K., Thomas, J.M., Li, S.W., Workman, D.J., Bentjen, S.A. & Smith, J.L. 1991. Field calibration of soil-core microcosm: ecosystem structural and functional comparisons. *Microb. Ecol.* **21**: 175-189.
- Bonish, P.M., Neville, F.J. & Lowther, W.L. 1980. Laboratory testing for numbers of viable rhizobia on commercially-pelleted legume seed. *New Zealand J. Experimental Agriculture* **8**: 139-143.

- Boonker, N.D., Weber, D.F. & Bezdicek, D.F.** 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia-populated soil. *Agronomy J.* **70**: 547-549.
- Boonkerd, N., Arunsri, C., Rungrattanakasin, W. & Vasuvat, Y.** 1985. Effects of post-emergence inoculation on field grown soybeans. *MIRCEN J.* **1**: 155-161.
- Bordeleau, L.M. & Antoun, H.** 1977. Effet de l'inoculation mixte avec des souches de *Rhizobium meliloti* sur le rendement de la luzerne cultivar Saranac. *Can. J. Plant Sci.* **57**: 1071-1075.
- Bordeleau, L.M. & Prévost, D.** 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil* **161**: 115-125.
- Bottomley, P.J.** 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. En: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, R. Burris & H. Evans (eds.). Chapman & Hall, pp. 293-348.
- Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-465.
- Breil, B.T., Ludden, P.W. & Triplett, E.W.** 1993. DNA sequence and mutational analysis of genes involved in the production and resistance of the antibiotic peptide trifolitoxin. *J. Bacteriol.* **175**: 3693-3702.
- Brewin, N.J., Beringer, J.E. & Johnston, A.W.B.** 1980. Plasmid mediated transfer of host range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 413-420.
- Brockman, F.J. & Bezdicek, D.F.** 1989. Diversity within serogroups of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in the Palouse region of eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance, and topography. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 109-115.
- Brockwell, J.** 1977. Application of legume seed inoculants. En: *A treatise on dinitrogen fixation*. R.W.F. Hardy & A.H. Gibson (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, pp. 277-309.
- Brockwell, J.** 1982. Plant-infection counts of rhizobia in soils. En: *Nitrogen fixation in legumes*. J.M. Vincent (ed.). Academic Press, Australia, pp. 41-58.
- Brockwell, J., Gault, R.R., Chase, D.L., Turner, G.L. & Bergersen, F.J.** 1985. Establishment and expression of soybean symbiosis in a soil previously free of *Rhizobium japonicum*. *Aust. J. Agric. Res.* **36**: 397-409.
- Brockwell, J., Herridge, D.F., Morthorpe, L.J. & Roughley, R.J.** 1988. Numerical effects of *Rhizobium* population on legume symbiosis. En: *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture*. D.P. Beck & L.A. Materon (eds.). Icarda, Nijhoff, Dordrecht, pp. 179-193.
- Brockwell, J., Roughley, R.J. & Herridge, D.F.** 1987. Population dynamics of *Rhizobium japonicum* strains used to inoculate three successive crops of soybean. *Aust. J. Agric. Res.* **38**: 61-74.

- Brokamp, A. & Schmidt, F.R.J. 1990. Survival of *Alcaligenes xylosoxidans* degrading 2,2-dichloropropionate and horizontal transfer of its halidohydrolase gene in a soil microcosm. *Curr. Microbiol.* **22**: 299-306.
- Bromfield, E.P.S., Barran, L.R. & Wheatcroft, R. 1995. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from the soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Mol. Ecol.* **4**: 183-188.
- Bromfield, E.P.S. & Jones, D.G. 1979. The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled antibiotic resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. *Ann. Appl. Biol.* **91**: 211-219.
- Bromfield, E.P.S., Lewis, D.M. & Barran, L.R. 1985. Cryptic plasmid and rifampicin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *J. Bacteriol.* **164**: 410-413.
- Bromfield, E.P.S., Sinha, I.B. & Wolynetz, M.S. 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1077-1084.
- Buendía-Clavería, A.M., Rodríguez-Navarro, D.N., Santamaría-Linaza, C., Ruiz-Saíenz, J.E. & Temprano-Vera, F. 1994. Evaluation of the symbiotic properties of *Rhizobium fredii* in european soils. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 155-160.
- Byrne, M.E., Roach, D.A. & Skurray, R.A. 1989. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamycin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* **81**: 361-367.
- Campbell, A., Berg, D., Botstein, D., Lederberg, E., Novick, R., Starlinger, P. & Szybalski, W. 1977. Nomenclature of transposable elements in prokaryotes. En: DNA insertion elements, plasmids and episomes. A.I. Bukhari, J.A. Shapiro & S.L. Adhya (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 15-22.
- Carrol, B.J. & Mathews, A. 1990. Nitrate inhibition of nodulation in legumes. En: Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation. P.M. Gresshoff (ed.). CRC Press, pp. 159-180.
- Catroux, G. & Amarger, N. 1992. Rhizobia as soil inoculant in agriculture. En: Release of genetically engineered and other microorganisms. J.C. Fry & M.J. Day (eds.). Cambridge University Press, pp. 1-13.
- Casadesús, J. & Olivares, J. 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **174**: 203-209.
- Cebolla, A., Ruíz-Berraquero, F. & Palomares, A.J. 1993. Stable tagging of *Rhizobium meliloti* with the firefly luciferase gene for environmental monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2511-2519.
- Chater, K.F., Henderson, D.J., Bibb, M.J. & Hopwood, D.A. 1988. Genome flux in *Streptomyces coelicolor* and other streptomycetes and its possible relevance to the evolution of mobile antibiotic resistance determinants. En: Transposition. A.J. Kingsman, K.F. Chater & S. M. Kingsman (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 7-42.

- Chatterjee, A., Balatti, P.A., Gibbons, W. & Pueppke, S.G. 1990. Interaction of *Rhizobium fredii* USDA257 and nodulation mutants derived from it with the agronomically improved soybean cultivar McCall. *Planta* **180**: 303-311.
- Chen, W.X., Yan, G.H. & Li, J.L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International J. System. Bacteriol.* **38**: 392-397.
- Chun, J.-Y. & Stacey, G. 1994. A *Bradyrhizobium japonicum* gene essential for nodulation competitiveness is differentially regulated from two promoters. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 248-255.
- Ciafardini, G. & Barbieri, C. 1987. Effects of cover inoculation of soybean on nodulation nitrogen fixation and yield. *Agronomy J.* **79**: 645-648.
- Comai, L. & Kosuge, T. 1983. Transposable element that causes mutations in a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. *J. Bacteriol.* **154**: 1162-1167.
- Contreras, A., Molin, S. & Ramos, J.L. 1991. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1504-1508.
- Cook, J.P., Weller, D.M., Kovacevick, P., Drahos, D., Hemming, B., Barnes, G. & Pierson, E.L. 1991. Establishment, monitoring, and termination of field tests with genetically altered bacteria applied to wheat for biological control of take-all. En: *Biological monitoring of genetically engineered plants and microbes*. D.R. MacKenzie & S.C. Henry (eds.). Agricultural Research Institute, Bethesda, Md., pp. 177-187.
- Corich, V., Giacomini, A., Ollero, F.J., Squartini, A. & Nuti, M.F. 1991. Pulsed-field electrophoresis in contour-clamped homogenous electric fields. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**: 193-198.
- Crozat, Y., Cleyet-Marel, J.C., Giraud, J.J. & Obaton, M. 1982. Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. *Soil Biol. Biochem.* **14**: 401-405.
- Cubo, M.T., Buendía-Clavería, A.M., Beringer, J.E. & Ruiz-Sáinz, J.E. 1988. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1812-1817.
- Cunningham, S.D., Kollmeyer, W.D. & Stacey, G. 1991. Chemical control of interstrain competition for soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1886-1892.
- Curley, R.L. & Burton, J.C. 1975. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. *Agronomy J.* **67**: 807-808.
- Curtiss, R. III. 1988. Engineering organisms for safety: What is necessary? En: *The release of genetically-engineered micro-organisms*. M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner & D.E. Stewart-Tull (eds.). Academic Press, London, pp. 7-20.
- Cuskey, S.M. 1988. En: *The release of genetically-engineered microorganisms*. M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner & D.E. Stewart-Tull (eds.). Academic Press, London, pp. 233-234.

- Daniels, M.J., Downie, J.A. & Osbourn, A.E. (Eds.). 1994. Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. (Vol 3). Kluwer Academic Publishers.
- Date, R.A. & Roughley, R.J. 1977. Preparation of legume inoculants. En: A treatise on dinitrogen fixation. R.W.F. Hardy & A.H. Gibson (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, pp. 243-276.
- Davidson, F. & Reuszer, H.W. 1978. Persistence of *Rhizobium japonicum* on the soybean seed coat under controlled temperature and humidity. Appl. Environ. Microbiol. **35**: 94-96.
- Davis, E.O., Evans, I.J. & Johnston, A.W.B. 1988. Identification of *nodX*, a gen that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. Mol. Gen. Genet. **212**: 531-535.
- De Boer, M.H. & Djordjevic, M.A. 1995. The inhibition of infection thread development in the cultivar-specific interaction of *Rhizobium* and subterranean clover is not caused by a hypersensitive response. Protoplasma **185**: 1-2.
- De Boer, M.H., Roddam, L.F., Rolfe, B.G. & Djordjevic, M.A. 1994. Analysis of early nodulation steps in clover-*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* interactions. En: 1st. European Nitrogen Fixation Conference. G. Kiss & G. Endre (eds.). Szeged, Hungary, p. 311.
- De Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2180-2187.
- De Leij, F.A.A.M., Bailey, M.J., Whipps, J.M. & Lynch, J.M. 1993. A simple MPN technique for the sensitive recovery of a genetically-modified *Pseudomonas aureofaciens* from soil. Lett. Appl. Microbiol. **16**: 307-310.
- De Leij, F.A.A.M., Sutton, E.J., Whipps, J.M., Fenlon, J.S. & Lynch, J.M. 1995. Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 3443-3453.
- Demezas, D.H. & Bottomley, P.J. 1986. Interstrain competition between representatives of indigenous serotypes of *Rhizobium trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 1020-1025.
- Demezas, D.H., Reardon, T.B., Watson, J.M. & Gibson, A.H. 1991. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analysis. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3489-3495.
- Denarié, J. & Roche, P. 1992. *Rhizobium* nodulation signals. En: Molecular signals in plant-microbe communications. D.P.S. Verma (ed.). CRC Press, Boca Ratón, FL, pp. 295-324.
- Deng, W., Gordon, M.P. & Nester, E. 1995. Sequence and distribution of IS312: evidence for horizontal DNA transfer from *Rhizobium meliloti* to *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. **177**: 2554- 2559.

- Díaz, E., Munthali, M., De Lorenzo, V. & Timmis, K.N. 1993. Recombinant gene containment: a new strategy involving protein antibiotics. En: Final sectorial meeting on biosafety and first sectorial meeting on microbial ecology. (Abstr.). Commission of the European Communities, Brussels, Belgium & CSIC, EEZ, Granada, Spain, pp. 71-72.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. & Helinski, D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria. Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 77: 7347-7351.
- Domsch, K.H., Driesel, A.J., Goebel, W., Andersch, W., Lindenmaier, W., Lotz, W., Reber, H. & Schmidt, F. 1988. Considerations on release of gene-technologically engineered microorganisms into the environment. FEMS Microbiol. Ecol. 53: 261-272.
- Donckendorff, T.C., Sanjuan, J., Grob, P. & Stacey, G. 1995. NodA represses *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 7: 596-602.
- Dowdle, S.F. & Bohlool, B.B. 1985. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1171-1176.
- Dowling, D.N. & Broughton, W.J. 1986. Competition for nodulation of legumes. Annu. Rev. Microbiol. 40: 131-157.
- Dowling, D.N., Stanley, J. & Broughton, W.J. 1989. Competitive nodulation blocking of Afghanistan pea is determined by *nodABC* and *nodFE* alleles in *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Gen. Genet. 216: 170-174.
- Downie, J.A., Davies, A.E., Sutton, J.M., Dean, G., Ghelani, S., Lea, E.J.A., Wilson, K.E. & Firmin, J.L. 1994. The roles of *nodX* and *nodO* in host specific nodulation of peas and vetch by *Rhizobium leguminosarum*. En: 1st. European Nitrogen Fixation Conference. G. Kiss & G. Endre (eds.). Szeged, Hungary, pp. 54-58.
- Drahos, D.J., Barry, G.F., Hemming, B.C., Brandt, E.J., Kline, E.L., Skipper, H.D. & Kluepfel, D.A. 1992. Use of *lacZY* chromosomal marker system to study spread and survival of genetically engineered bacteria in soil. En: Environmental release of genetically engineered microorganisms. M.J. Day & J.C. Fry (eds.). Academic Press Ltd. London, pp. 147-159.
- Drahos, D.J., Hemming, B.C. & McPherson, S. 1986. Tracking recombinant organisms in the environment: β -galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. Bio/Technology 4: 439-444.
- Dubnau, D. 1991a. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev. 55: 395-424.
- Dubnau, D. 1991b. The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 5: 11-18.
- Dusha, I., Kovalenko, S., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. 1987. *Rhizobium meliloti* insertion element IS*Rm2* and its use for the identification of the *fixX* gene. J. Bacteriol. 169: 1403-1409.

- Edwards, C. (eds.). 1993. Monitoring genetically manipulated microorganisms in the environment. Wiley Biotechnology Series. John Wiley & Sons Ltd.
- Elegba, M.S. & Rennie, R.J. 1984. Effect of different inoculant adhesive agents on rhizobial survival, nodulation and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). *Can. J. Soil Sci.* **64**: 631-636.
- Engvild, K.C., Jensen, E.S. & Skot, L. 1990. Parallel variation in isoenzyme and nitrogen fixation markers in a *Rhizobium* population. *Plant and Soil* **128**: 283-286.
- Evguenieva, E., Große, B., Selenska-Pobell, S & Klingmüller, W. 1994. Identifizierung und charakterisierung *nif*-gene tragender *Enterobacter agglomerans* stämme mit PFGE und hybridisierung. En: Überwachungsmethoden Gentechnik. Bundesumweltamt, Berlin, pp. 491-496.
- Evguenieva-Hackenberg, E., Selenska-Pobell, S & Klingmüller, W. 1994. Persistence and stability of genetically manipulated derivatives of *Enterobacter agglomerans* in soil microcosm. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 179-192.
- Farber, J.M. & Addison, C.J. 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 242-250.
- Fawcett, T.W. & Barlett, S.G. 1991. An efficient and reliable method for the elimination of "artifact banding" when sequencing double-stranded DNA templates. *Comments, USB* **17**: 19-20.
- Ferrante, A.A. & Lessie, T.G. 1991. Nucleotide sequence of IS402 from *Pseudomonas cepacia*. *Gene* **102**: 143-144.
- Figurski, D.H. & Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1648-1652.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E. & Downie, J.A. 1993. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol. Microbiol.* **10**: 351-360.
- Flores, M., González, V., Brom, S., Martínez, E., Piñero, D., Romero, D., Dávila, G. & Palacios, R. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* sp. *J. Bacteriol.* **169**: 5782-5788.
- Fowler, J. & Cohen, L. 1993. Practical statistics for field biology. John Wiley & Sons Ltd.
- Frederickson, J.K., Bentjen, S.A., Bolton Jr., H., Li, S.W. & Van Voris, P. 1989. Fate of Tn5 mutants of root-growth inhibiting *Pseudomonas* sp. in intact soil-core microcosms. *Can. J. Microbiol.* **35**: 867-873.
- Frederickson, J.K., Bezdicek, D.F., Brockmann, F.J. & Li, S.W. 1988. Enumeration of Tn5 mutant bacteria in soil by using a most-probable-number-DNA hybridization procedure and antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 446-456.

- Frey, S.D. & Blum, L.K. 1995. Effect of pH on competition for nodule occupancy by type I and type II strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Plant and Soil* **163**: 157-164.
- Gaffney, T.D. & Lessie, T.G. 1987. Insertion-sequence-dependent rearrangements of *Pseudomonas cepacia* plasmid pTGL1. *J. Bacteriol.* **169**: 224-230.
- Galas, D.J. & Chandler, M. 1989. Bacterial insertion sequences. En: *Mobile DNA*. D.E. Berg & M.M. Howe (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 143-144.
- Gallagher, S.R. (Ed.). 1992. *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*. Academic Press Inc.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T. & Kado, C.I. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**: 918-921.
- Gibson, A.H. 1968. Nodulation failure in *Trifolium subterraneum* L. cv. Woogenellup (Syn Marrar). *Aust. J. Agric. Sci.* **19**: 907-918.
- Glenn, A.R. & Dilworth, M.J. 1994. The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 1-10.
- Gordon, D.M., Wexler, M., Reardon, T.B. & Murphy, P.J. 1995. The genetic structure of *Rhizobium* populations. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 491-497.
- Graham, P.H. 1992. Stress tolerance of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 485-492.
- Graham, P.H. & McDermott, T.R. 1989. *Bradyrhizobium*, root and rhizosphere interactions to improve soybean productivity. En: *The Physiology, Biochemistry, Nutrition and Bioengineering of soybeans: Implications for Future Management*. R.D. Munson (ed.). Potash & Phosphate Institute, Atlanta, G.A., pp. 1-18.
- Guerrero, R. & Pedrós-Alió, C. (Eds.) 1993. *Trends in microbial ecology. Proceedings of the Sixth International Symposium on Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology (SEM).
- Güssow, D. & Clackson, T. 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17** (10).
- Hagedorn, C. 1978. Effectiveness of *Rhizobium trifolii* populations associated with *Trifolium subterraneum* L. in southwest Oregon soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **42**: 447-451.
- Hahn, D., Kester, R., Starrenburg, M.J.C. & Akkermans, A.D.L. 1990. Extraction of rRNA from soil for detection of *Frankia* with oligo-nucleotide probes. *Arch. Microbiol.* **154**: 329-335.
- Hahn, J., Albano, M. & Dubnau, D. 1987. Isolation and characterization of Tn917 *lac*-generated competence mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3104-3109.
- Hahn, M. & Hennecke, H. 1988. Cloning and mapping of a novel nodulation region from *Bradyrhizobium japonicum* by genetic complementation of a deletion mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 55-61.

- Handelsman, J. & Brill, W.J. 1985. *Erwinia herbicola* isolates from alfalfa plants may play a role in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 818-821.
- Handelsman, J., Ugalde, R.A. & Brill, W.J. 1984. *Rhizobium meliloti* competitiveness and the alfalfa agglutinin. J. Bacteriol. **157**: 703-707.
- Hartmann, A. & Amarger, N. 1991. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting, and insertion sequence typing. Can. J. Microbiol. **37**: 600-608.
- Harrison, S.P., Gareth Jones, D., Schunmann, P.H.D., Forster, J.W. & Young, J.P.W. 1988. Variation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* Sym plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. J. Gen. Microbiol. **134**: 2721-2730.
- Harrison, S.P., Mytton, L.R., Skøt, L., Dye, M. & Cresswell, A. 1992. Use of RAPD fingerprints in soil *Rhizobium* population studies. Can. J. Microbiol. **38**: 1009-1015.
- Hattermann, D. & Stacey, G. 1990. Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 833-836.
- Hattori, M. & Sakaki, Y. 1986. Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. Anal. Biochem. **152**: 232-238.
- Heinemann, J.A. 1991. Genetics of gene transfer between species. T. Genet. **7**: 181-185.
- Hely, F.W., Hutchings, R.J. & Zorin, M. 1976. Legume inoculation by spraying suspensions of nodule bacteria into soils beneath seed. J. Aust. Inst. Agric. Sci. **42**: 241-244.
- Henschke, R.B. & Schmidt, F.R.J. 1990. Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora *in situ*. Curr. Microbiol. **20**: 105-110.
- Herbert, R.A. 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. Methods Microbiol. **129**: 207-212.
- Heron, D.S., Ersek, T., Krishnan, H.B. & Pueppke, S.G. 1989. Nodulation mutants of *Rhizobium fredii* USDA257. Mol. Plant-Microbe Interact. **2**: 4-10.
- Hervás, A. & Lluch, C. 1991. Ecología de *Rhizobium* en el suelo. En: Aportaciones a la Biología de la Fijación del Nitrógeno Atmosférico. M. Megías, A.J. Palomares & F. Ruiz (eds.), pp. 357-370.
- Hill, K.E., Fry, J.C. & Weightman, A.J. 1994. Gene transfer in the aquatic environment: persistence and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon. Microbiology **140**: 1555-1563.
- Hiltbold, A.E., Patterson, R.M. & Reed, R.B. 1985. Soil populations of *Rhizobium japonicum* in a cotton-corn-soybean rotation. Soil Sci. Soc. Am. J. **49**: 343-348.

- Hiltbold, A.E., Thurlow, D.L. & Skipper, H.D. 1980. Evaluation of commercial soybean inoculants by varicous techniques. *Agronomy J.* **72**: 675-681.
- Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**: 211-237.
- Hirsch, P. 1988. Assessing the environmental risk of releasing genetically manipulated organisms. En: Science and change in agriculture. J. Hardcastle (ed.). AFRC, London, pp. 4-5.
- Hirsch, P.R. & Spokes, J.R. 1988. *Rhizobium leguminosarum* as a model for investigating gene transfer in soil. En: Risk assessment for deliberate releases. W. Klingmuller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 10-17.
- Hofte, M., Mergeay, M. & Verstraete, W. 1990. Marking the *Rhizopseudomonas* strain 7NSK₂ with a Mu d(*lac*) element for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1046-1052.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K. & Tiedje, J.M. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 703-711.
- Honeycut, R.J., McClelland, M. & Sobral, B.W. 1993. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 2021. *J. Bacteriol.* **175**: 6945-6952.
- Hovens, C.M. & Wilks, A.F. 1989. Rapid screening of highly complex cDNA libraries using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17** (11).
- Howieson, J.G. & Ewing, M.A. 1986. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. *Aust. J. Agric. Res.* **37**: 55-64.
- Huber, I & Selenska-Pobell, S. 1994a. Characterization of *Rhizobium galegae* by REP-PCR, PFGE and 16S rDNA sequencing. En: Proc. 14th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation. P.H. Graham, M.J. Sadowski & C.P. Vance (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Huber, I & Selenska-Pobell, S. 1994b. Pulsed-field gel electrophoresis-fingerprinting, *rrn* loci number and genome size estimations of several *Rh. galegae* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 522-533.
- Hynes, M.F. & O'Connell, M.P. 1990. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.* **36**: 864-869.
- Iida, S., Meyer, J. & Arber, W. 1983. Prokaryotic IS elements En: Mobile Genetic Elements. J.A. Shapiro (ed.). Academic Press, N.Y., pp. 159-221.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds.). 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press Inc.
- Ippen-Ihler, K. 1989. Bacterial conjugation. En: Gene transfer in the environment. S.B. Levy & R.V. Miller (eds.). McGraw-Hill Book Co., N.Y., pp. 33-72.
- Ish-Horowicz, D. & Burke, J.F. 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids Res.* **9**: 2989-2998.

- Israel, D.W., Wollum II, A.G. & Mathis, J.N. 1988. Relative performance of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains under different environmental conditions. En: ISI atlas of science: animal and plant sciences. Institute of Scientific Information, Philadelphia. Vol. 1: 95-99.
- Jansen Van Rensburg, H. & Strijdom, B.W. 1974. Quality control of *Rhizobium* inoculants produced from sterilized and non-sterile peat in South-Africa. *Phytophylactica* 6: 307-310.
- Jarrett, P. & Stephenson, M. 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1608-1614.
- Jenkins, M.B. & Bottomley, P.J. 1985. Evidence for a strain of *Rhizobium meliloti* dominating the nodules of alfalfa. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 326-328.
- Jensen, E.S. & Sorensen, L.H. 1987. Survival of *Rhizobium leguminosarum* in soil after addition as inoculant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 221-226.
- Jensen, M.A., Webster, J.A. & Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 945-952.
- Jiménez-Zurdo, J.I., Van Dillewijn, P., Soto, M.J., De Felipe, M.R., Olivares, J. & Toro, N. 1995. Characterization of a *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 492-498.
- Johnston, A.W.B. & Beringer, J.E. 1975. Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetics markers. *J. Gen. Microbiol.* 87: 343-350.
- Jordan, E., Saedler, H. & Starlinger, P. 1968. 0° and strong-polar mutations in the *gal* operon are insertions. *Mol. Gen. Genet.* 102: 353-363.
- Josey, D.P., Beynon, J.L., Johnston, A.W.B. & Beringer, J.E. 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 343-350.
- Judd, A.K., Schneider, M., Sadowsky, M. & De Bruijn, F. 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1702-1708.
- Kaijalainen, S. & Lindström, K. 1989. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *J. Bacteriol.* 171: 5561-5566.
- Kamicker, B.J. & Brill, W.J. 1986. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 487-492.
- Kearney, B., Ronald, P., Dahlbeck, D. & Staskawicz, B.J. 1988. Molecular basis for evasion of plant host defence in bacterial spot disease of pepper. *Nature (London)* 332: 541-543.

- Kearney, B. & Staskawicz, B.J.** 1990. Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *J. Bacteriol.* **172**: 143-148.
- Kerr, A.** 1989. Commercial release of a genetically engineered bacterium for the control of crown gall. *Plant Dis.* **73**: 15-18.
- Khachatourians, G.G.** 1986. Production and use of biological pest control agents. *T. Biotech.* **4**: 120-124.
- Kieser, H.M., Kieser, T. & Hopwood, D.A.** 1992. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 5496-5507.
- Killham, K.** Soil ecology. 1994. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kim, C.-H., Tully, R.E. & Keister, D.L.** 1989. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium fredii* HH303 which are symbiotically effective. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1852-1854.
- King, R.J., Short, K.A. & Seidler, R.J.** 1991. Assay for detection and enumeration of genetically engineered microorganisms which is based on the activity of a deregulated 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1790-1792.
- Kingsley, M.T. & Bohlool, B.** 1981. Release of *Rhizobium* spp. from tropical soils and recovery for immunofluorescence enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 241-248.
- Kinkle, B.K., Sadowsky, M.J., Johnstone, K. & Koskinen, W.C.** 1994. Tellurium and selenium resistance in Rhizobia and its potential use for direct isolation of *Rhizobium meliloti* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1674-1677.
- Klopper, J.W., Lifshitz, R. & Zablutowicz, R.M.** 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *T. Biotech.* **7**: 39-44.
- Knauf, V.C. & Nester, E.W.** 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* **8**: 45-54.
- Kohl, D.H., Kenelly, E.J., Zhu, Y., Schubert, K.R. & Shearer, G.** 1991. Proline accumulation, nitrogenase (C₂H₂ reducing) activity, and activities of enzymes related to proline metabolism in drought stressed soybean nodules. *J. Exp. Bot.* **42**: 831-837.
- Kohl, D.H., Lin, J.J., Shearer, G. & Schubert, K.R.** 1990. Activities of the pentose phosphate pathway and enzymes of proline metabolism in the legume root nodules. *Plant Physiol.* **94**: 1258-1264.
- Kohl, D.H., Schubert, K.R., Carter, M.B., Hagedam, C.H. & Shearer, G.** 1988. Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: Energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2036-2040.
- Kohl, D.H., Straub, P. & Shearer, G.** 1994. Does proline play a special role in bacteroid metabolism? *Plant Cell Environ.* **17**: 1257-1262.
- Kokjohn, T.A.** 1989. Transduction: mechanism and potential for gene transfer in the environment. En: Gene transfer in the environment. S.B. Levy & R.V. Miller (eds.). McGraw-Hill Book Co., N.Y., pp. 73-97.

- Kokotek, W. & Lotz, W. 1989. Construction of a LacZ-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promotor probe. *Gene* **84**: 467-471.
- Kosier, B., Pühler, A. & Simon, R. 1993. Monitoring the diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements. *Mol. Ecol.* **2**: 35-46.
- Kosslak, R.M., Joshi, R.S., Bowen, B.A., Paaren, H.E. & Appelbaum, E.R. 1990. Strain-specific inhibition of *nod* gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1333-1341.
- Kremer, J.R. & Peterson, H.L. 1982. Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculated seed. *Soil Sci.* **134**(2): 117-125.
- Krishnan, H.B. & Pueppke, S.G. 1991. A *nolA-lacZ* gene fusion in *Rhizobium fredii* facilitates direct assessment of competition for nodulation of soybean. *Can. J. Microbiol.* **38**: 515-519.
- Krishnan, H.B. & Pueppke, S.G. 1992. Inactivation of *nolC* conditions developmental abnormalities in nodulation of Peking soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 14-21.
- Krishnan, H.B. & Pueppke, S.G. 1993. Characterization of RFRS9, a second member of the *Rhizobium fredii* repetitive sequence family from the nitrogen-fixing symbiont *R. fredii* USDA257. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 150-155.
- Kuykendall, L.D., Devine, T.E. & Cregan, P.B. 1982. Positive role of nodulation on the establishment of *Rhizobium japonicum* in subsequent crops of soybean. *Curr. Microbiol.* **7**: 79-81.
- Lacy, G.H. 1978. Genetic studies with plasmid RP1 in *Erwinia chrysanthemi* strains pathogenic on maize. *Phytopathology* **68**: 1323-1330.
- Lagacherie, B., Giniès, P. & Amarger, N. 1976. L'inoculation du lupin. Essais préliminaires. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France.* **62**: 987-994.
- Laguerre, G., Allard, M.-R., Revoy, F. & Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 56-63.
- Laguerre, G., Bardin, M. & Amarger, N. 1993a. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. *Can. J. Microbiol.* **39**: 1142-1149.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S.I., Rodriguez Casartelli, R. & Amarger, N. 1993b. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* **39**: 412-419.
- Laguerre, G., Mazurier, S.I. & Amarger, N. 1992. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **107**: 17-26.

- Lai, E., Birren, B.W. & Clark, S.M. 1989. Pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechniques* **7**: 34-42.
- Lederberg, E.M. & Cohen, S.N. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **119**: 1072-1074.
- Lee, J. & Smith, H. 1988. Sizing of the *Haemophilus influenzae* Rd genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **170**: 4402-4405.
- Leff, L.G., McArthur, J.V. & Shimkets, L.J. 1992. Information spiraling: Movement of bacteria and their genes in streams. *Microbiol. Ecol.* **24**: 11-24.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C. & Denarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.
- Levy, S.B. & Marshall, B.M. 1988. Genetic transfer in the natural environment. En: The release of genetically-engineered micro-organisms. M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner & D.E. Stewart-Tull (Eds.). Academic Press, London, pp. 61-76.
- Levy, S.B. & Miller, R.V. 1989. En: Gene transfer in the environment. Mc Graw-Hill, N.Y.
- Lewin, B. 1990. Transposons that mobilize via DNA. En: Genes IV. Cell Press, Cambridge, Mass. Oxford University Press, Walton Street, Oxford OX2 6DP, pp. 649-671.
- Lewis-Henderson, W.R. & Djordjevic, M.A. 1991a. A cultivar-specific interaction between *R. leguminosarum* bv. *trifolii* and subterranean clover is conditioned by *nodM*, other bacterial cultivar specificity gene, and a single recessive host gene. *J. Bacteriol.* **173**: 2791-2799.
- Lewis-Henderson, W.R. & Djordjevic, M.A. 1991b. *nodT*, a positively-acting cultivar specificity determinant controlling nodulation of *Trifolium subterraneum* by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Plant Mol. Biol.* **16**: 515-526.
- Li, W.-H. & Graur, D. (eds.). 1991. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass.
- Lindemann, W.C., Schmidt, E.L. & Ham, G.E. 1974. Evidence for double infection within soybean nodules. *Soil Sci.* **118**: 274-279.
- Lindow, S.E. 1992. Ice⁻ strains of *Pseudomonas syringae* introduced to control ice nucleation active strains on potato. En: Biological control of plant diseases. E.S. Tjamos (ed.). Plenum Press, N.Y., pp. 169-174.
- López-Lara, I.M., Lugtemberg, B.J.J. & Spaink, H.P. 1993. Comparison of the lipo-oligosaccharides produced by various *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strains. VI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno, p. 103.
- Lorenz, M.G., Aardema, B.W. & Wackernagel, W. 1988. Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 107-112.

Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1993a. Bacterial gene transfer in the environment. En: Transgenic organisms-risk assessment of deliberate release. W. Wöhrmann & J. Tomiuk (eds.). Birkhäuser-Verlag, Basel, pp. 43-64.

Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1993b. Transformation as a mechanism for bacterial gene transfer in soil and sediment-studies with a sand/clay microcosm and the cyanobacterium *Synechocystis* OL50. En: Trends in microbial ecology. R. Guerrero & C. Pedrós-Alió (eds.). Spanish Society for Microbiology (SEM), Barcelona, pp. 325-330.

Lugtenberg, B.J.J., Díaz, C., Smit, G., De Pater, S. & Kijne, J.W. 1991. Role of lectin in the *Rhizobium*-legume symbiosis. En: Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. H. Hennecke & D.P.S. Verma (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol 1, pp. 174-181.

Machida, Y., Sakurai, M., Kiyokawa, S., Ubasawa, A., Suzuki, Y. & Ikeda, J.E. 1984. Nucleotide sequence of the insertion sequence found in the T-DNA region of mutant Ti plasmid pTiA66 and distribution of its homologues in octopine Ti plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**: 7495-7499.

Maley, J. & Roberts, I.S. 1994. Characterization of IS1126 from *Porphyromonas gingivalis* W83: a new member of the IS4 family of insertion sequence elements. FEMS Microbiol. Lett. **123**: 219-224.

Manceau, C., Gardan, L. & Devaux, M. 1986. Dynamics of RP4 plasmid transfer between *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* and *Erwinia herbicola* in hazelnut tissues, in planta. Can. J. Microbiol. **32**: 835-841.

Masood, E. & Dickson, D. 1995. Biosafety rules will regulate international GMO transfers. Nature **378**: 326.

Mathis, L.S. & Scocca, J.J. 1982. *Haemophilus influenzae* and *Neisseria gonorrhoeae* recognize different specificity determinants in the DNA uptake step of genetic transformation. J. Gen. Microbiol. **128**: 1159-1161.

Mazurier, S.I., Rigottier-Gois, L. & Amarger, N. 1996. Characterization, distribution and localization of ISR12, an insertion sequence isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Appl. Environ. Microbiol. En prensa.

McNeil, D.C. 1982. Variations in ability of *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybean and maintain fixation in the presence of nitrate. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 647-652.

McPerson, M.J., Quirke, P. & Taylor, G.R. (Eds.). 1993. PCR. A practical approach. IRL Press. Oxford University Press.

Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E. & Ausubel, F.M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by Tn5 mutagenesis. J. Bacteriol. **149**: 114-122.

Mellor, H.Y., Glenn, A.R., Arwas, R. & Dilwort, M.J. 1987. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TA1. Arch. Microbiol. **148**: 34-39.

- Naik, G.A., Bhat, L.N., Chopade, B.A. & Lynch, J.M. 1994. Transfer of broad-host-range antibiotic resistance plasmids in soil microcosms. *Curr. Microbiol.* **28**: 209-215.
- Newton, C.R. & Graham, A. 1994. PCR. BIOS Scientific Publishers Limited.
- Nick, G. & Lindström, K. 1994. Use of repetitive sequences and the Polymerase Chain Reaction to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium galegae* strains and to identify the DNA obtained by sonicating the liquid cultures and root nodules. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 265-273.
- Noel, K.D. & Brill, W.J. 1980. Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 931-938.
- Nybom, H. & Kraft, T. 1995. Application of DNA fingerprinting to the taxonomy of European blackberry species. *Electrophoresis* **16**: 1731-1735.
- Nyström, T., Albertson, N.H., Flärdh, K. & Kjelleberg, S. 1990. Physiological and molecular adaptation to starvation and recovery from starvation by the marine *Vibrio*. *Microbiol. Ecol.* **74**: 129-140.
- Obaton, M. 1971. Influence de la composition chimique du sol sur l'utilité de l'inoculation des graines de luzerne avec *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil Special volume*: 273-285.
- O'Flaherty, S., Moëgne-Loccoz, Y., Boesten, B., Higgins, P., Dowling, D.N., Condon, S. & O'Gara, F. 1995. Greenhouse and field evaluations of an autoselective system based on an essential thymidylate synthase gene for improved maintenance of plasmid vectors in modified *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4051-4056.
- Ogawa, J., Brierley, H.L. & Long, S.R. 1991. Analysis of *Rhizobium meliloti* nodulation mutant WL131: novel insertion sequence *IS_{Rm3}* in *nodG* and altered *nodH* protein product. *J. Bacteriol.* **173**: 3060-3065.
- Ogram, A., Sayler, G.S. & Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* **7**: 57-66.
- O'Kane, D.J., Lingle, W.L., Wampler, J.E., Legocki, M., Legocki, R.P. & Szalay, A.A. 1988. Visualization of bioluminescence as a marker of gene expression in rhizobium-infected soybean root nodules. *Plant Mol. Biol.* **10**: 387-399.
- Olivares, J. 1994. La fijación biológica de nitrógeno en el contexto de la producción de alimentos y protección del ambiente. Discurso de ingreso como académico en la Real Academia de Farmacia.
- Olivares, J., Casadesús, J. & Bedmar, E.J. 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 967-970.
- Olivares, J., Soto, M.J., Sanjuan, J. & Toro, N. 1993. Genetics of *Rhizobium* competitiveness. En: *Trends in microbial ecology*. R. Guerrero & Pedrós-Alió (eds.). Spanish Society for Microbiology (SEM), pp. 277-280.
- Olsen, P.E. & Rice, W.A. 1989. *Rhizobium* strain identification and quantification in commercial inoculants by immunoblot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 520-522.

Ozawa, T. & Yamaguchi, M. 1986. Fractionation and estimation of particle-attached and unattached *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 911-914.

Palomares, A.J., De Luca, M.A. & Helinski, D.R. 1989. Firefly luciferase as a reporter enzyme for measuring gene expression in vegetative and symbiotic *Rhizobium meliloti* and other gram-negative bacteria. *Gene* **81**: 55-64.

Pearson, W.R. & Lipman, D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.

Philpotts, H. 1979. *Rhizobium* strains and inoculation rate for direct drilled lupins. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* **45**: 251-253.

Pickup, R.W. 1991. Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1009-1019.

Pillai, S.D. & Pepper, I.L. 1991. Transposon Tn5 as an identifiable marker in rhizobia: Survival and genetic stability of Tn5 mutant bean rhizobia under temperature stressed conditions in desert soils. *Microbiol. Ecol.* **21**: 21-33.

Polard, P., Prère, M.F., Fayet, O. & Chandler, M. 1992. Transposase-induced excision and circularization of the bacterial insertion sequence IS911. *EMBO J.* **11**: 5079-5090.

Possee, R.D., King, L.A., Weitzman, M.D., Mann, S.G., Hughes, D.S., Cameron, I.R., Hirst, M.L. & Bishop, D.H.L. 1992. Progress in the genetic modification and field release of baculovirus insecticides. En: *The release of genetically modified microorganisms*, 2. D.E.S. Stewart-Tull & M. Sussman (eds.). Plenum Press, N.Y., pp. 47-58.

Poulsen, L.K., Larsen, N.W., Molin, S. & Andersson, P. 1989. A family of genes encoding a cell-killing function may be conserved in all gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **3**: 1463-1472.

Pretorius-Güth, I.M., Pühler, A. & Simon, R. 1990. Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in Alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2354-2359.

Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Denarié, J., Promé, J.C. & Broughton, W.J. 1992. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* **6**: 3575-3584.

Priefer, U.B. 1989. Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *J. Bacteriol.* **171**: 6161-6168.

Priefer, U.B., Kalinowski, J., Rüger, B., Heumann, W. & Pühler, A. 1989. ISR1, a transposable DNA sequence resident in *Rhizobium* class IV strains, shows structural characteristics of classical insertion elements. *Plasmid* **21**: 120-128.

Prosser, J.I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. *Microbiology* **140**: 5-17.

Prozorov, A.A. 1995. Genome structure of bacteria: Uniformity or diversity? *Russian J. of Genetics* 31: 633-643.

Ramos, J.L., Duque, E. & Ramos-Gonzalez, M.-I. 1991. Survival in soil of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 260-266.

Ramos, J.L. & Timmis, K.N. 1987. Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. *Microbiol. Sci.* 4: 228-237.

Rattray, E.A.S., Tyrell, J.A., Prosser, J.I., Glover, L.A. & Killham, K. 1993. The effect of soil bulk density and temperature on wheat rhizosphere colonisation by *lux* modified *Pseudomonas fluorescens*. *Biol. Fertil Soils* 29

Rechcigl, J.E., Edmisten, K.L., Wolf, D.D. & Reneau Jr., R.B. 1987. Influence of calcium, nitrogen, and pH on alfalfa root growth and nitrogen fixation using the implanted soil mass technique. *Agronomy J.* 79: 926-928.

Rennie, R.J. & Dubetz, S. 1984. Multistrain vs. single strain *Rhizobium japonicum* inoculants for early maturing soybean cultivars: N₂ fixation quantified by ¹⁵N isotope dilution. *Agronomy J.* 76: 498-502.

Richardson, A.E., Simpson, R.J., Djordjevic, M.A. & Rolfe, B.G. 1988. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is affected by low pH and Ca and Al ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2541-2548.

Richaume, A. 1995. Las bacterias manipuladas. ¿amenazan el ambiente? *Mundo Científico* 153: 42-43.

Rigaud, J. & Puppo, A. 1975. Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.

Robertsen, B.K., Aiman, P., Darvill, A.G., McNeil, M. & Alberstein, P. 1981. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67: 389-400.

Rodríguez, R.L. & Tait, R.C. 1983. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.

Rogers, D.D., Warren Jr., R.D. & Chamblee, D.S. 1982. Remedial postemergence legume inoculation with *Rhizobium*. *Agronomy J.* 74: 613-619.

Roughley, R.J. 1988. Legume inoculants; their technology and application. En: Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture. D.P. Beck & L.A. Materon (eds.). Icarda, Nijhoff, Dordrecht. pp. 259-269.

Ruvkun, G.B., Long, S.R., Meade, H.M., Van den Bos, R.C. & Ausubel, F.M. 1982. *ISRml*: a *Rhizobium meliloti* insertion sequence that transposes preferentially into nitrogen fixation genes. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 405-418.

Sadowsky, M., Cregan, P.B., Göttfert, M., Sharma, A., Gerhold, D., Rodriguez-Quinones, F., Keiser, H., Hennecke, H. & Stacey, G. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum nola* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 637-641.

- Sadowsky, M., Kosslak, R.M., Madrzak, C.J., Golinska, B. & Cregan, P.B. 1995. Restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* is mediated by factors present in the roots of *Glycine max*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 832-836.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Harn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- Sanjuan, J. 1985. Estudio genético de un plásmido que controla propiedades simbióticas en *Rhizobium meliloti*. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada.
- Sanjuan, J. 1989. Identificación de genes regulados por *nifA* que afectan la infectividad y competitividad de *Rhizobium meliloti*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Sanjuan, J., Carlson, R.W., Spaink, H.P., Bhat, U.R., Barbour, W.M., Glushka, J. & Stacey, G. 1992. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 8789-8793.
- Sanjuan, J. & Olivares, J. 1989. Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. J. Bacteriol. **171**: 4154-4161.
- Sanjuan, J. & Olivares, J. 1991. NifA-NtrA regulatory system activates transcription of *nfe*, a gene locus involved in nodulation competitiveness of *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbiol. **155**: 543-548.
- Sargent, L., Huang, S.Z., Rolfe, B.G. & Djordjevic, M.A. 1987. Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 1611-1619.
- Sayler, G.S. & Layton, A.C. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. Annu. Rev. Microbiol. **44**: 625-648.
- Schiffman, J. & Alper, Y. 1968. Inoculation of peanuts by application of *Rhizobium* suspension into the planting furrows. Experimental Agriculture **4**: 219-226.
- Schmidt, F.R.J., Rosien, J. & Brokamp, A. 1990. The role of bacteria in risk assessment analysis. En: Bacterial genetics in natural environments. M.J. Day & J.C. Fry (Eds.). Chapman & Hall, London, pp. 207-215.
- Schmidt, T.M., Kopecky, K. & Nealon, K.H. 1989. Bioluminescence of the insect pathogen *Xanthorhabdus luminescens*. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 2607-2612.
- Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F. & Watson, J.M. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2942-2947.

Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D. & Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 192-196.

Schwinghamer, E.A. & Belkengren, R.P. 1968. Inhibition of rhizobia by a strain of *Rhizobium trifolii*: some properties of the antibiotic and of the strain. *Arch. Microbiol.* **64**: 130-145.

Scordilis, G.E., Ree, H. & Lessie, T.G. 1987. Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*. *J. Bacteriol.* **169**: 8-13.

Seidler, R.J. 1992. Evaluation of methods for detecting ecological effects from genetically engineered microorganisms and microbial pest control agents in terrestrial environments. *Biotech. Adv.* **10**: 149-178.

Selbitschka, W., Arnold, W., Jording, D., Kosier, B., Toro, N. & Pühler, A. 1995a. The insertion sequence element *ISRm2011-2* belongs to the *IS630-Tc1* family of transposable elements and is abundant in *Rhizobium meliloti*. *Gene* **163**: 59-64.

Selbitschka, W., Arnold, W., Priefer, U.B. & Pühler, A. 1991. Characterization of *recA* genes and *recA* mutants in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 86-95.

Selbitschka, W., Jording, D., Simon, R. & Pühler, A. 1995b. Insertion sequence (IS) elements as natural constituents of the genomes of gram-negative *Rhizobiaceae* and their use as a tool in ecological studies. En: Population genetics of bacteria. S. Baumberg, J.P.W. Young, E.M.H. Wellington & J.R. Saunders (eds.). Cambridge University Press. Cambridge, pp. 89-109.

Selbitschka, W., Pühler, A & Simon, R. 1992a. Bioluminescent *RecA* mutants of *Rhizobium* as model organisms in risk assessment studies. En: The release of genetically modified microorganisms-REGEM 2. D.S. Stewart-Tull & M. Sussman (eds.). Plenum Press, N.Y., pp. 225-227.

Selbitschka, W., Pühler, A & Simon, R. 1992b. The construction of *recA*-deficient *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* strains marked with *gusA* or *luc* cassettes for use in risk-assessment studies. *Mol. Ecol.* **1**: 9-19.

Selenska-Pobell, S., Gigova, L. & Petrova, N. 1995. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 425-431.

Shapiro, J.A. 1969. Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **40**: 93-105.

Sharma, P.C., Hüttel, B., Winter, P., Kahl, G., Gardner, R.C. & Weising, K. 1995. The potential of microsatellites for hybridization- and polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and related species. *Electrophoresis* **16**: 1755-1761.

Sharma, S.B. & Signer, E.R. 1990. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* plants revealed by transposon *Tn5-gusA*. *Genes Develop.* **4**: 344-356.

Shaw, J.J. & Kado, C.I. 1986. Development of a *Vibrio* bioluminescence gene-set to monitor phytopathogenic bacteria during the ongoing disease process in a non-disruptive manner. *Bio/Technology* 4: 560-564.

Short, K.A., Seidler, R.J. & Olson, R.H. 1990. Survival and degradative capacity of *Pseudomonas putida* induced or constitutively expressed plasmid mediated degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate (TFD) in soil. *Can. J. Microbiol.* 36: 821-826.

Sicardi de Mallorca, M. & Labandera, C. 1978. Quality control of commercial inoculants for legumes in Uruguay (1963-1975). *Revista Latino-americana de Microbiología* 20: 153-160.

Simon, R., Hötte, B., Klauke, B. & Kosier, B. 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors. *J. Bacteriol.* 173: 1502-1508.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-791.

Skipper, H.D., Palmer, J.H., Giddens, J.E. & Woodruff, J.M. 1980. Evaluation of commercial soybean inoculants from South Carolina and Georgia. *Agronomy J.* 72: 673-674.

Smit, E., Van Elsas, J.D., Van Veen, J.A. & De Vos, W. 1991. Detection of plasmid transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous bacteria in soil by using bacteriophage ϕ R2f for donor counterselection. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3482-3488.

Smith, G.R. 1988. Homologous recombination in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 52: 1-28.

Smith, R.S. 1987. Production and quality control of inoculants. En: *Symbiotic nitrogen fixation technology*. G.H. Elkan (ed.). Marcel Dekker, Inc. N.Y., pp. 391-411.

Smith, R.S., Ellis, M.A. & Smith, R.E. 1981. Effect of *Rhizobium japonicum* inoculant rates on soybean nodulation in a tropical soil. *Agronomy J.* 73: 505-508.

Smith, T.F. & Waterman, M.S. 1981. Comparison of bio-sequences. *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

Sobral, B.W.S., Honeycut, R.J. & Atherly, A.G. 1991. The genomes of the family rhizobiaceae: size, stability and rarely cutting restriction endonucleases. *J. Bacteriol.* 173: 704-709.

Somasegaran, P. & Bohloul, B. 1990. Single-strain versus multistrain inoculation: Effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean and dry bean. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3298-3303.

Soto, M.J. 1993. Caracterización de los genes *nfe* implicados en la infectividad y competitividad de *Rhizobium meliloti*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Soto, M.J., Zorzano, A., García-Rodríguez, F.M., Mercado-Blanco, J., López-Lara, M.I., Olivares, J. & Toro, N. 1994. Identification of a novel *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency *nfe* gene homolog of *Agrobacterium* ornithine cyclodeaminase. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 7: 703-707.

- Soto, M.J., Zorzano, A., Mercado-Blanco, J., Lepek, V., Olivares, J. & Toro, N. 1993. Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes *nfe*. *J. Mol. Biol.* **229**: 570-576.
- Soto, M.J., Zorzano, A., Olivares, J. & Toro, N. 1992a. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* GR4 insertion sequence *ISRm3* linked to the nodulation competitiveness locus *nfe*. *Plant Mol. Biol.* **20**: 307-309.
- Soto, M.J., Zorzano, A., Olivares, J. & Toro, N. 1992b. Sequence of *ISRm4* from *Rhizobium meliloti* strain GR4. *Gene*, **120**: 125-126.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spaink, H.P., Geiger, O., Sheeley, D.M., Van Brussel, A.A.N., York, W.S., Reinhold, W.N., Lugtenberg, B.J.J. & Kennedy, E.P. 1991a. The biochemical function of *Rhizobium leguminosarum* proteins involved in the production of host-specific K signal molecules. En: *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. H. Hennecke & D.S.P. Verma (eds.). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, pp. 142-149.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Tak, T. & Roo, L.G. 1989. Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid *nodD* product. *J. Bacteriol.* **171**: 4045-4053.
- Spaink, H.P., Sheeley, D.M., Van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, W.N. & Lugtenberg, B.J.J. 1991b. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**: 125-130.
- Stacey, G. & Upchurch, R.G. 1984. *Rhizobium* inoculation legumes. *T. Biotech.* **2**: 65-70.
- Steffan, R.J. & Atlas, R.M. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2185-2191.
- Steffan, R.J. & Atlas, R.M. 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 137-161.
- Steffan, R.J., Goksoyr, J., Bej, A.K. & Atlas, R.M. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2908-2915.
- Stewart, G.J. 1989. The mechanism of natural transformation. En: *Gene transfer in the environment*. S.B. Levy & R.V. Miller (eds.). McGraw-Hill Book Co., N.Y., pp. 139-164.
- Stocker, B.A.D. 1990. Aromatic-dependent *Salmonella* as live vaccine presenters of foreign inserts in flagellin. *Res. Microbiol.* **141**: 787-796.
- Stotzky, G. 1989. Gene transfer among bacteria in soil. En: *Gene transfer in the environment*. S.B. Levy & R.V. Miller (eds.). McGraw-Hill Book Co., N.Y., pp. 165-222.

- Stotzky, G., Broder, M.W., Doyle, G.D. & Jones, R.A. 1993. Selected methods for the detection and assessment of ecological effects resulting from the release of genetically engineered microorganisms to the terrestrial environment. *Adv. Appl. Microbiol.* **38**: 1-98.
- Stotzky, G. & Krasovsky, V. N. 1981. Ecological factors that affect the survival, establishment, growth and genetic recombination of microbes in natural habitats. En: *Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmid*. S.B. Levy, R.C. Clowes & E.L. Koenig (Eds.). Plenum Press, London. pp. 31-42.
- Streeter, J.G. 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can. J. Microbiol.* **40**: 513-522.
- Streeter, J.G., Salminen, S.O., Whitmoyer, R.E. & Carlson, R.W. 1992. Formation of novel polysaccharides by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 607-613.
- Streit, W., Bjourson, A.J., Cooper, J.E. & Werner, D. 1993. Application of subtraction hybridization for the development of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* and *Rhizobium tropici* group-specific DNA probe. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 59-68.
- Stupi, R. & Brummet, S.R. 1991. Suggestions for DNA sequencing. *Comments, USB* **18**: 20-21.
- Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B. & Ronson, C.W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8985-8989.
- Szabo, L.J. & Mills, D. 1984. Integration and excision of pMC7105 in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: involvement of repetitive sequences. *J. Bacteriol.* **157**: 821-827.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4767-4771.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. 1989. Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4076-4080.
- Temprano, F., Rodríguez-Navarro, D.N. & Orive, R. 1991. Competencia por la nodulación entre estirpes de *Rhizobium* y su importancia agrícola. En: *Aportaciones a la Biología de la Fijación del Nitrógeno Atmosférico*. M. Megías, A.J. Palomares & F. Ruiz (eds.), pp. 371-382.
- Theng, B.K.G. 1979. Nucleic Acids. En: *Formation and properties of clay-polymer complexes, Development in soil science 9*. B.K.G. Theng (Ed.). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 227-236.
- Thompson, J.A. 1988. Selection of *Rhizobium* strains. En: *Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture*. D.P. Beck & L.A. Materon (eds.). Icarda. Nijhoff, Dordrecht, pp. 207-223.

Tichy, H.-V. & Simon, R. 1994. Rapid species confirmation of bacterial strains isolated from the rhizosphere using restriction analysis of amplified ribosomal DNA. En: Biotech sectorial meeting on microbial ecology and biosafety. (Abstr.). Commission of the European Communities, Brussels, Belgium & Department of Microbiology, University College, Cork, Ireland, p. 65.

Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R.E. & Regal, P.J. 1989. The planned introduction of genetically modified organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* **70**: 298-315.

Toro, N. 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J. Microbiol. Biotech.* **12**: 157-162.

Toro, N. & Olivares, J. 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 331-335.

Toro, N., Soto, M.J., Sanjuan, J. & Olivares, J. 1992. Molecular genetics of nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. En: Profiles on Biotechnology. T.G. Villa & J. Abalde (eds.). Universidad de Santiago de Compostela, pp. 701-705.

Trevors, J.T., Van Elsas, J.D., Van Overbeek, L.S. & Starodub, M.E. 1990. Transport of a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 401-408.

Triplett, E.W. 1990a. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 98-103.

Triplett, E.W. 1990b. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 199-206.

Triplett, E.W. & Barta, T.M. 1987. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. *Plant Physiol.* **85**: 335-342.

Triplett, E.W., Breil, B.T. & Splitter, G.A. 1994. Expression of *tfx* and sensitivity to the rhizobial peptide antibiotic trifolitoxin in a taxonomically distinct group of alpha-proteobacteria including the animal pathogen *Brucella abortus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4163-4166.

Triplett, E.W., Lethbridge, B., Midland, S.L., Tate, M.E. & Sims, J.J. 1988. Cloning of genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24 responsible for the production of trifolitoxin, an anti-rhizobial peptide involved in nodulation competitiveness. En: Nitrogen fixation: Hundred years after. H. Bothe, F.J. De Bruijn & W.E. Newton (eds.). Stuttgart: Gustav Fischer.

Triplett, E.W. & Sadowsky, M.J. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 399-428.

Van Brussel, A.A.N., Bakhuzien, R., Van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J. & Kijne, J.W. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**: 70-72.

Van Elsas, J.D., Govaert, J.M. & Van Veen, J.A. 1987. Transfer of plasmid pFT30 between bacilli in soil as influenced by bacterial population dynamics and soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* **19**: 639-647.

Van Elsas, J.D., Nikkel, M. & Van Overbeek, L.S. 1989. Detection of plasmid RP4 transfer in soil and rhizosphere, and occurrence of homology to RP4 in soil bacteria. *Curr. Microbiol.* **19**: 375-381.

Van Elsas, J.D., Trevors, J.T. & Starodub, M.E. 1988a. Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**: 299-306.

Van Elsas, J.D., Trevors, J.T. & Starodub, M.E. 1988b. Plasmid transfer in soil and rhizosphere. En: Risk assessment for deliberate releases. W.J. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin. pp. 89-99.

Vanderleyden, J., Desair, J., De Meirsmann, C., Michiels, K., Van Gool, A.P., Chilton, M.D. & Jen, G.C. 1986. Nucleotide sequence of an insertion sequence (IS) element identified in the T-DNA region of a spontaneous variant of the Ti-plasmid pTiT37. *Nucleic Acids Res.* **14**: 6699-6709.

Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823-6831.

Villadas, P.J., Burgos, P., Jording, D., Selbitschka, W., Pühler, A & Toro, N. 1996. Comparative analysis of the genetic structure of a *Rhizobium meliloti* field population before and after environmental release of the highly competitive *R. meliloti* strain GR4. *FEMS Microbiol. Ecol.* En prensa.

Villadas, P.J., Velázquez, E., Martínez-Molina, E. & Toro, N. 1995. Identification of nodule-dominant *Rhizobium meliloti* strains carrying pRmeGR4b type plasmid within indigenous soil populations by PCR using primers derived from specific DNA sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 161-168.

Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford. IBP Handbook, vol. **15**.

Vincent, J.M. 1980. Factors controlling the legume-rhizo symbiosis. En: Nitrogen fixation. W.E. Newton & W.H. Orme-Johnson (eds.). University Press, Baltimore, Mass. Vol. **II**, pp. 103-129.

Viteri, S.E. & Schmidt, E.L. 1987. Ecology of indigenous soil rhizobia: response of *Bradyrhizobium japonicum* to readily available substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1872-1875.

Viteri, S.E. & Schmidt, E.L. 1989. Chemoautotrophy as a strategy in the ecology of indigenous soil bradyrhizobia. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 451-463.

Von Heijne, G. 1987. Sequence analysis in Molecular Biology. Treasure trove or Trivial pursuit. Academic Press Inc.

Walker, G.C. 1984. Mutagenesis and inducible response to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**: 60-93.

Wang, Z., Crawford, D.L., Magnuson, T.S., Bleakley, B.H. & Hertel, G. 1991. Effects of bacterial lignin peroxidase on organic carbon mineralisation in soil, using recombinant *Streptomyces* strains. *Can. J. Microbiol.* **37**: 287-294.

Weaver, R.W. & Frederick, L.R. 1972. Effect of inoculum size on nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill, variety Ford. *Agronomy J.* **64**: 597-599.

Weaver, R.W. & Frederick, L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse studies. *Agronomy J.* **66**: 229-232.

Weaver, R.W., Frederick, L.R. & Dumenil, L.C. 1972. Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of *Rhizobium japonicum* in Iowa soils. *Soil Sci.* **114**: 137-141.

Weising, K., Atkinson, R.G. & Gardner, R.C. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Meth. Appl.* **4**: 249-255.

Wellington, E.M.H. & Van Elsas, J.D. (eds.). 1992. Genetic interactions among microorganisms in the natural environment. Pergamon Press Ltd. Oxford.

Wheatcroft, R. & Laberge, S. 1991. Identification and nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* insertion sequence *ISRm3*: similarity between the putative transposase encoded by *ISRm3* and those encoded by *Staphylococcus aureus* *IS256* and *Thiobacillus ferrooxidans* *IST2*. *J. Bacteriol.* **173**: 2530-2538.

Wheatcroft, R. & Watson, R.J. 1987. Identification and characterization of insertion sequence *ISRm1* in *Rhizobium meliloti* JJ1c10. *Can. J. Microbiol.* **33**: 314-321.

Wheatcroft, R. & Watson, R.J. 1988a. A positive strain identification method for *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 574-576.

Wheatcroft, R. & Watson, R.J. 1988b. Distribution of insertion sequence *ISRm1* in *Rhizobium meliloti* and other gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 113-121.

Willems, A. & Collins M.D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bact.* **43**: 305-313.

Williams, B. 1993. Biostatistics. Concepts and applications for biologists. Chapman & Hall, Inc.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.* **18**: 6531-6535.

Winarno, R. & Lie, T.A. 1979. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation. Interaction between nodulating and nonnodulating strains. *Plant and Soil* **51**: 131-142.

Winstanley, C., Morgan, J.A.W., Pickup, R.W., Jones, J.G. & Saunders, J.R. 1989. Differential regulation of lambda *pL* and *pR* promoters by a *cI* repressor in a broad-host-range thermoregulated plasmid marker system. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 770-777.