

UN PLASMIDO DE *Rhizobium loti* INVOLUCRADO EN LA COMPETENCIA POR LA NODULACION

P. Irisarri

Aceptado: 17 de febrero de 1997

RESUMEN

La cepa U226 de *Rhizobium loti* posee un único plásmido críptico de 220 Mdal. Con el objetivo de estudiar funciones codificados por este plásmido, se lo marcó con Tn5-mob-sac y se sometió a la cepa a un tratamiento de cura de plásmido. Se evaluó el comportamiento de la cepa curada y la cepa salvaje en simbiosis con *Lotus corniculatus*. La eliminación del plásmido no afectó la infectividad ni la efectividad de la fijación de nitrógeno. Sin embargo, en plántulas de lotus inoculadas con diferentes proporciones de la cepa con el plásmido y la cepa curada, se encontró que la cepa portadora del plásmido ocupaba la mayoría de los nódulos. Esto indicaría que el plásmido de la cepa de *R. loti* U226 está involucrado en la competencia por la ocupación de los nódulos.

PALABRAS CLAVE: competencia, plásmido, *Rhizobium loti*.

SUMMARY

A *Rhizobium loti* PLASMID INVOLVED IN NODULATION COMPETITIVENESS

Rhizobium loti U226 strain harbors a megaplasmid of about 220 Mdal. To investigate the possible role of this plasmid in the ability of the *Rhizobium* to form effective nodules, a plasmid-cured derivative strain was constructed using the Tn5-mob-sac system. The wild type and plasmid-cured strain were coupled in their ability to form a symbiosis with *Lotus corniculatus*. There were no differences in the infectivity or the effectivity of the two bacterial strains. Nevertheless, when lotus plantlets were inoculated with a mixture of strains with and without plasmid, the strain harboring the plasmid occupied the majority of the nodules. This result would indicate that the plasmid from *R. loti* U226 is implicated in competence for nodule occupation.

KEY WORDS: competitiveness, plasmid, *Rhizobium loti*.

INTRODUCCION

Las bacterias del género *Rhizobium* forman nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de leguminosas. En la mayoría de las especies de *Rhizobium*, los genes de la nodulación (*nod*) y los genes para la fijación de nitrógeno (*nif* y *fix*) están codificados en megaplásmidos denominados plásmidos simbióticos (pSym) (Rosemberg *et al.*, 1981). Poco se conoce sobre los plásmidos no simbióticos presentes en *Rhizobium* y es probable que tengan un papel significativo en la simbiosis y ecología de estas bacterias.

Entre las propiedades conocidas codificadas por plásmidos no simbióticos se encuentran la producción de bacteriocinas (Hirsch, 1980) y melanina (Cubo *et al.*, 1988). En *R. meliloti*, plásmidos no simbióticos llevan los genes responsables de la síntesis de polisacáridos extracelulares (Hynes *et al.*, 1986), biosíntesis de tiamina (Finan *et al.*, 1986), transporte de dicarboxilatos (Watson *et al.*, 1988), síntesis de β -galactosidasa (Charles *et al.*, 1989), competi-

tividad por la nodulación (Bromfield *et al.*, 1985), sensibilidad a fagos (Corral *et al.*, 1975) y sobrevivencia en suelo seco (Sanjuán y Olivares, 1988).

La cura de plásmidos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* demostró que diferentes plásmidos estaban involucrados en la utilización de distintas fuentes de carbono e influenciaban la movilidad, producción de lipopolisacáridos, utilización de nitrato y actividad de enzimas específicas (Baldani *et al.*, 1992).

En *R. loti*, a diferencia de las otras especies del género *Rhizobium*, los genes simbióticos están localizados en el cromosoma (Pankhurst *et al.*, 1983; Chua *et al.*, 1985; Monza *et al.*, 1992) y hasta el momento no se conocen funciones codificadas por plásmidos. Con el objetivo de identificar algún fenotipo codificado por el plásmido de la cepa U226 de *R. loti* se obtuvo una cepa curada del plásmido y se comparó su comportamiento con el de la cepa salvaje.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Bacterias y plásmidos

Cepas o plásmidos	Características relevantes	Referencia
<i>Rhizobium loti</i>		
U226	Un plásmido críptico de 220 Mdal (pRlo226). Inoculante comercial para lotus.	Dept. Microbiol. Univ. New South Wales, Kensington, Australia
PIA4	Derivada de U226 con inserto Tn5-mob-sac en el plásmido (=pRlo4)	Este trabajo.
PIA4C	Derivada de PIA4 curada de pRlo4	Este trabajo
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
UBAPF2	Rif ^R , sin plásmidos	Hynes <i>et al.</i> , 1985.
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	thi, pro, hsdR recA derivado de RP4 integrado al cromosoma	Simon <i>et al.</i> , 1983.
HB101	pro, leu, thi, lacY, endA, recA hsdR hsdM Str ^R	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969.
Plásmidos:		
pMH1701	pBR325::Tn5-mob-sac Ap ^R Cm ^R	Hynes <i>et al.</i> , 1989.
pRK2013	Km ^R , rep ColE1 con funciones tra de RK2	Figurski y Helinski, 1979.

Perfil de plásmidos

El control de los patrones plasmídicos se efectuó por electroforesis vertical en geles de agarosa 0,7%, según el método descrito por Eckhardt (1978) modificado para *R. loti* por Monza *et al.* (1992).

Mutagénesis del plásmido con Tn5-mob-sac

Para la mutagénesis por transposición se empleó la técnica de conjugación descrita por Simon *et al.* (1986). La transferencia del plásmido pMH1701 se hizo desde la cepa donadora S17.1 de *Escherichia coli* a la cepa receptora U226 de *R. loti*. La selección de portadores del Tn5-mob-sac se realizó en medio mínimo-agar (Vincent, 1975) con 120 µg/mL de kanamicina (km) (Fig. 1).

Para seleccionar los transconjugantes que llevan la inserción del Tn5-mob-sac en el plásmido, se evaluó la capaci-

dad de transferencia del plásmido marcado a *Agrobacterium tumefaciens* cepa UBAPF2. La conjugación triparental se realizó según Ditta *et al.* (1980) y se utilizó el pRK2013 como plásmido movilizador (Fig. 1). La selección de los transconjugantes se realizó en medio TY (Beringer, 1974) con 150 µg/mL de rifampicina (rf) y 100 µg/mL de km.

Un clon de la cepa U226 de *R. loti* con inserción plasmídica del Tn5-mob-sac, designado como PIA4, se sometió a tratamiento de cura del plásmido.

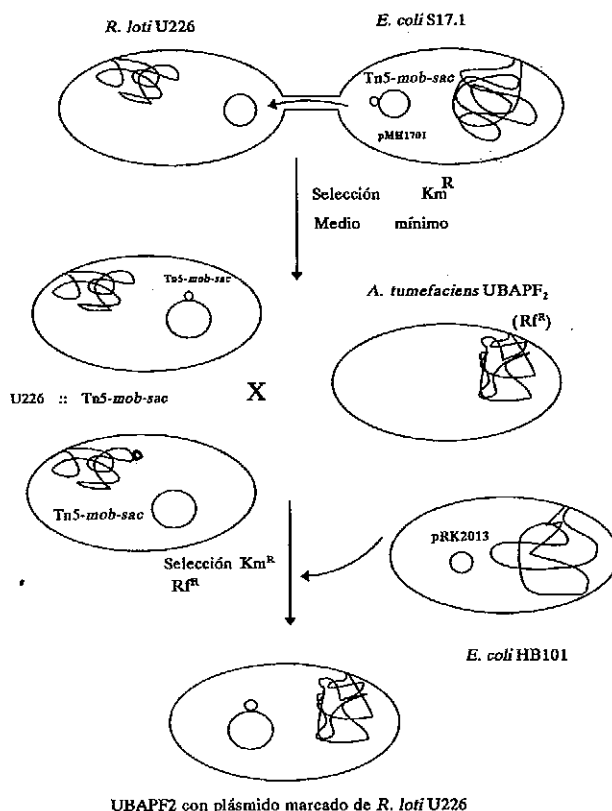


Figura 1. Esquema del marcaje con Tn5-mob-sac del plásmido de *R. loti* U226. Los tamaños relativos no se corresponden con los reales.

Cura del plásmido

La eliminación del plásmido marcado se realizó según el método descrito por Hynes *et al.* (1989) por plaqueo en medio TY con 5 g/Litro de sacarosa e incubación a 36°C durante 3 días y luego otros 3 días a 28°C. Se comprobó la sensibilidad a km de las colonias emergentes y la pérdida del plásmido de esas colonias se confirmó por análisis del perfil plasmídico por electroforesis en geles de agarosa.

Producción de bacteriocinas

Se realizó según la técnica descrita por Pugsley y Oudega (1987). Se evaluó la capacidad de producir bacteriocinas de la cepa PIA4 de *R. loti* frente a las cepas PIA4C y U226.

Condiciones de crecimiento de las plantas

Para los ensayos en simbiosis se usó como leguminosa hospedadora *L. corniculatus* cv. San Gabriel. Las semillas se esterilizaron en superficie según Vincent (1970) y se pregerminaron en placas de Petri sobre papel de filtro húmedo. La siembra se realizó a razón de 3 plantas por tubo que contenía 20 mL de medio Jensen-agar 12% (Jensen, 1942) o de 5 plantas por jarra Leonard con vermiculita como soporte y solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975). Las plantas crecieron en cámara de crecimiento con fotoperíodo 16/8 h (luz/oscuridad), $500 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (400-700 nm) de intensidad lumínica, 25/18°C de temperatura (día/noche). En todos los ensayos las plántulas fueron inoculadas a las 24 horas después de la siembra. El diseño del experimento fue en parcelas al azar.

Actividad nitrogenasa y producción de hidrógeno

La actividad de la nitrogenasa se determinó midiendo por cromatografía gaseosa la capacidad de reducir acetileno a etileno (Hardy *et al.*, 1973). El H_2 producido por la nitrogenasa se midió por cromatografía gaseosa según Schubert y Evans (1976). Para ambas determinaciones se utilizaron muestras de raíces noduladas de 5 plantas crecidas durante 30 días en jarras Leonard.

La eficiencia relativa se calculó según Schubert y Evans (1976) como: $\text{ER} = 1 - \text{H}_2 \text{ producido} / \text{acetileno reducido (ARA)}$.

Infectividad

Se inocularon 12 tubos con la cepa U226 y 12 tubos con la cepa PIA4C a razón de 1 mL de inóculo por tubo. La concentración de los inóculos fue aproximadamente de 10^8 células/mL. Se registró diariamente el número de nódulos formados en cada planta.

Competencia

Plántulas de lotus se inocularon con mezclas de PIA4 y PIA4C en diferentes proporciones con una concentración celular de aproximadamente 10^8 células/mL. La proporción real de cada cepa en la mezcla de inoculación se estableció por conteo en placas de TY y TY con $120 \mu\text{g}/\text{mL}$ de km.

El control se inoculó con las cepas U226 y PIA4 en proporción 50:50.

Los nódulos se cosecharon a las 8 semanas de la inoculación y se desinfectaron superficialmente según Vincent (1970). Para determinar el porcentaje de nódulos ocupados por las distintas cepas se maceraron nódulos y se sembraron en medio YEM con y sin km.

RESULTADOS Y DISCUSION

Mutagénesis del plásmido con Tn5-mob-sac

Para mutagenizar el plásmido de la cepa U226 de *R. loti* se transfirió desde *E. coli* S17.1 el plásmido pMH1701, portador del transposón Tn5 con los genes *sacB* y *sacR* de

Bacillus subtilis. Estos genes confieren sensibilidad a sacarosa en bacterias Gram negativas y se han usado con éxito para curar plásmidos de diferentes tamaños en rizobios (Moënné-Leccoz *et al.*, 1995). La ventaja de esta metodología es que permite la selección directa de los derivados curados que crecen en medio con sacarosa (Hynes y Mc Gregor, 1990). La evaluación de 20 colonias resultantes de la conjugación triparental (*A. tumefaciens* UBAPF2 x *R. loti* PIA4 x *E. coli* HB101 (pRK2013)), reveló que el 85% de las inserciones eran plasmídicas dado que conferían resistencia a km a *A. tumefaciens* UBAF2. Estos resultados indican que el plásmido de U226 constituiría un lugar preferencial para la inserción de Tn5-mob. Sin embargo, Hynes *et al.* (1989) encontraron que el Tn5-mob-sac se ubicaba en plásmidos y cromosoma con una frecuencia directamente proporcional al tamaño de los mismos.

Eliminación del plásmido

A partir de una colonia de la cepa PIA4 que lleva una inserción plasmídica del Tn5-mob-sac se realizó siembra en medio YEM-agar con 5% de sacarosa y se incubó a 36°C. La pérdida de la resistencia a km de las colonias emergentes en el 87% de los casos indica que la frecuencia de inactivación de los genes *sac* sin pérdida de resistencia a km fue muy baja. El análisis del perfil de plásmidos de 22 colonias sensibles a km permitió comprobar que en 16 colonias se había perdido el plásmido. No pudo distinguirse por su movilidad electroforética el plásmido original de la cepa U226 de aquellos probablemente delecionados que provenían de colonias sensibles a km y que mantenían al plásmido.

Una colonia curada del plásmido a la que se denominó PIA4C, se seleccionó para realizar los ensayos en simbiosis.

Eficiencia e infectividad

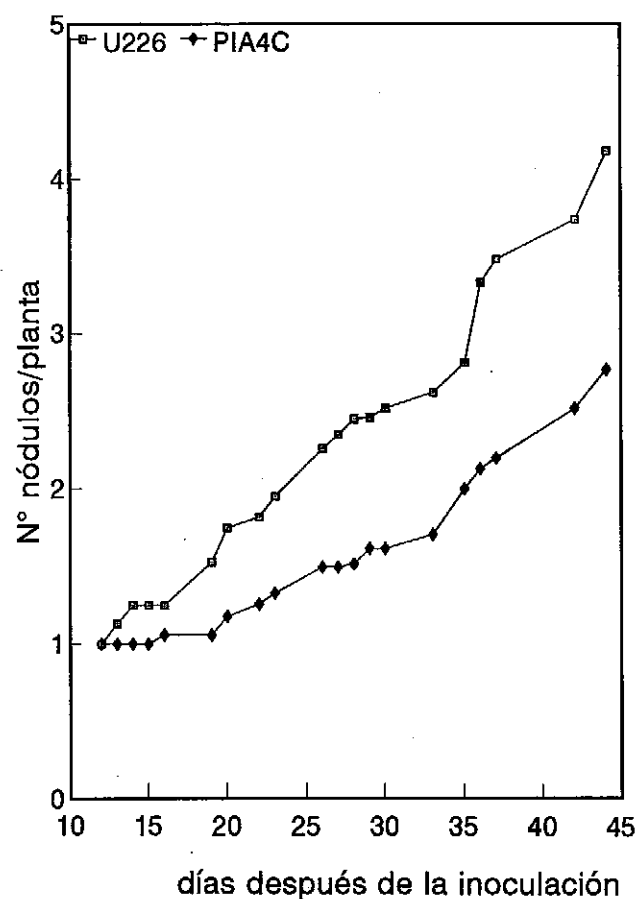
Para evaluar la eficiencia de fijación de nitrógeno, los parámetros de rendimiento considerados fueron mg peso seco de parte aérea/planta, mg peso fresco/nódulo y número de nódulos/planta. Como se observa en la Tabla 2 no se evidenciaron diferencias significativas entre la producción de H_2 y ARA de la cepa de *R. loti* U226 y su derivada curada de plásmido (PIA4C). Estos resultados difieren de lo encontrado por Pankhurst *et al.* (1986), en nódulos de *L. pedunculatus* inducidos por dos cepas de *R. loti* curadas de su plásmido donde las cepas curadas exhibieron mayores valores de ARA respecto a las parentales. En *R. meliloti* SAF22 también se observó un aumento en la efectividad de fijación de nitrógeno con la pérdida de un plásmido críptico (Velásquez *et al.*, 1995).

La aparición del primer nódulo se evidenció 11 días después de la inoculación tanto para la cepa PIA4C como para U226. Cuarenta y cuatro días después de la inoculación la cepa U226 había formado un número de nódulos por planta significativamente superior ($P=0,05$) que el formado por PIA4C (Fig. 2). El número de nódulos por planta formados por cada cepa no fue significativamente

Tabla 2. Eficiencia relativa de nódulos de *L. corniculatus* inducidos por las cepas U226 y PIA4C.

	Cepas	
	U226	PIA4C
H ₂ producido (μmol/g PF.h)	2,7 ± 0,3	3,0 ± 0,4
C ₂ H ₂ reducido (μmol/g PF.h)	15,0 ± 3,0	12,3 ± 0,7
Eficiencia relativa	0,81	0,75

Los valores corresponden a medias de 3 repeticiones ± desvío estándar. Las medias no difieren significativamente entre cepas (P = 0,05)

**Figura 2.** Cinética de la formación de nódulos en *L. corniculatus* en simbiosis con las cepas PIA4C y U226.

diferente cuando los tiempos después de la inoculación fueron inferiores a 40 días. En un plásmido críptico de la cepa GR4 de *R. meliloti*, Sanjuán y Olivares (1989) encontraron una región de 5Kb denominada *nfe* (eficiencia de formación de nódulos). Los mutantes *nfe* mostraron un atraso en el tiempo de nodulación respecto a la cepa salvaje y una disminución en la competitividad. La relación entre la velocidad de nodulación y la capacidad competitiva no está clara. Mientras algunos autores sostienen que la velocidad de nodulación y la capacidad competitiva están correlacionadas (Zdor y Pueppke, 1988), otros autores señalan que ambos caracteres no están relacionados (Oliveira y Graham, 1990).

Competencia

En la Tabla 3 aparece el porcentaje de nódulos ocupados por cada una de las cepas y el porcentaje de cada una de ellas presente en el inoculante.

Considerando la proporción en la mezcla de inoculación, la cepa PIA4 ocupó un número de nódulos significativamente superior al esperado. Se consideraron nódulos ocupados por la cepa PIA4 aquellos a partir de los cuales se obtuvieron colonias en medio YEM km 100 μg/mL. Se estimó que la cepa PIA4C ocupó el resto de los nódulos y no se determinó el número de nódulos ocupados simultáneamente por ambas cepas. Pankhurst *et al.* (1986) inoculando *L. pedunculatus* con mezclas de cepas de *R. loti* con y sin plásmido, encontraron entre el 1 y el 5% de nódulos ocupados por dos cepas. Para detectar la doble ocupación de nódulos puede marcarse la cepa con una doble resistencia antibiótica. Esta estrategia tiene

Tabla 3. Competitividad entre *R. loti* PIA4 y su derivado curado PIA4C por la nodulación en *L. corniculatus*.

Inoculante (%)	Nódulos ocupados	Nódulos ocupados	Nódulos testados
	PIA4(%)	PIA4C(%)	
PIA4 : PIA4C			
100 : 0	100	0	80
74 : 26	100	0	72 ^a
54 : 46	100	0	72 ^a
24 : 76	88	12	50 ^a
0 : 100	0	100	61
PIA4 : U226 (Control)	PIA4(%)	U226(%)	
38 : 62	40	60	70 ns

^a El porcentaje de nódulos ocupados por cada cepa difiere significativamente del esperado si ambas cepas fuesen igualmente competitivas (P=0,01).

ns Diferencias no significativas.

como inconveniente que puede alterar la capacidad competitiva u otras propiedades simbióticas de la cepa (Bromfield *et al.*, 1985).

En otros rizobios se ha comprobado la codificación plasmídica de la competencia por la nodulación. En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* cepa CNF42, la competitividad disminuye un 99% asociada a la pérdida de un plásmido (Brom *et al.*, 1992). Barbour y Elkan (1989) encontraron que un plásmido de 197 Mdal estaba involucrado en la competitividad de la cepa de *R. fredii* USDA 206. A su vez, en la cepa IZ50 de *R. meliloti*, una mutación espontánea a *rf* así como la presencia de un plásmido no simbiótico favorecían la competitividad (Bromfield *et al.*, 1985). Pankhurst *et al.* (1986) comunicaron que el aumento en la competitividad de dos cepas de *R. loti* curadas de su plásmido no estaba asociada a diferencias en el tiempo de generación, resistencia a flavolanos o aumento en el tamaño de los nódulos, sino a un aumento en la capacidad de formar nódulos en *L. pedunculatus*.

No se detectó producción de bacteriocinas por la cepa PIA4 de *R. loti* (datos no mostrados) y no se ha encontrado hasta la fecha una explicación sobre los mecanismos que operan en la competencia por la nodulación en esta especie de rizobio. El rol de las bacteriocinas en la competencia se ha estudiado especialmente en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. La producción de trifolitoxina, bacteriocina producida por la cepa T24 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, le confiere a esta cepa una alta competitividad cuando se coinocula con una cepa sensible (Triplett, 1990).

Las bases moleculares de la competitividad se están estudiando en varios laboratorios, ya que las cepas de rizobios seleccionadas por su alta eficiencia simbiótica, tendrían un escaso uso como inoculantes si fallan en la competencia por la nodulación frente a las cepas nativas.

Se ha considerado que la competencia por la nodulación estaba limitada a los eventos primarios de la iniciación del nódulo (Dowling y Broughton, 1986). Sin embargo, distintos resultados experimentales avalan la hipótesis que la competencia entre cepas sería en su mayor parte un fenómeno post-infección (Bohlool, 1989). La expresión de los genes *nfe* de *R. meliloti* cepa GR4 es dependiente de *NifA*, lo que implica que su expresión máxima se logra en estados avanzados del desarrollo del nódulo (Sanjuán y Olivares, 1989). La presencia de estos genes en *R. meliloti* aumenta su competitividad pero se desconoce el mecanismo causante de este efecto.

Todas las cepas capaces de nodular iniciarían sitios de infección pero serían desplazadas por las cepas más competitivas durante el crecimiento y desarrollo de los nódulos.

Los resultados aquí obtenidos permiten suponer que el plásmido de la cepa U226 de *R. loti* contribuye a la simbiosis ya que la ausencia del mismo disminuye la competencia por la nodulación en *L. corniculatus*.

AGRADECIMIENTOS

A Alicia Arias de la División Bioquímica del I.I.B.C.E. por su orientación en este trabajo. A los compañeros de la Cátedra de Bioquímica por su colaboración. Financiamiento PEDECIBA y Facultad de Agronomía.

BIBLIOGRAFIA

- BALDANI, J.I.; WEAVER, R.W.; HYNES, M.F. and EARDLY, B.D. 1992. Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2308-2314.
- BARBOUR, W.M. and ELKAN, G.H. 1989. Relationship of the presence and copy number of plasmids to exopolysaccharide production and symbiotic effectiveness in *R. fredii* USDA 206. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 813-818.
- BERINGER, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 188-198.
- BOHLOOL, B.B. 1989. A unifying concept in rhizobial interstrain competition for nodule occupancy. 12th. North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference Proc., Iowa. USA. pp 5.
- BOYER, H.W. and ROULLAND-DUSSOIX, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-465.
- BROM, S.; GARCIA, A.; STEPKOWSKY, T.; FLORES, M.; DAVILA, G.; ROMERO, D. and PALACIOS, R. 1992. Plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174: 5183-5189.
- BROMFIELD, E.S.P.; LEWIS, D.M. and BARRAN, L.R. 1985. Cryptic plasmid and rifampin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *J. Bacteriol.* 164: 410-413.
- CHARLES, T.C.; YAN, G. and FINAN, T.M. 1989. Megaplasmid encoded dehydrogenase and B-galactosidase enzymes in *Rhizobium meliloti*. p. 46. En: 12th North America Symbiotic Nitrogen Fixation Conference Proc. Iowa State University, Ames, Iowa.
- CHUA, K.Y.; PANKHURST, C.E.; MAC DONALD, P.E.; HOPCROFT, D.H.; JARVIS, B.D. and SCOTT, D.B. 1985. Isolation and characterization of transposon Tn5 induced symbiotic mutants of *Rhizobium loti*. *J. Bacteriol.* 162: 335-343.
- CORRAL, E.; MONTOYA, E. and OLIVARES, J. 1978. Sensitivity to phagos in *Rhizobium meliloti* as a plasmid consequence. *Microbios Lett.* 5: 77-80.
- CUBO, M.T.; BUENDIA-CLAVERIA, A.M.; BERINGER, J.E. and RUIZ-SAINZ, J.E. 1988. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1812-1817.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D. and 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.

- DOWLING, D.N. and BROUGHTON, W.J. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 131-157.
- ECKHARDT, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584-588.
- FIGURSKY, D.H. and HELINSKY, D.R. 1979. Replication of an origin containing derivative plasmid RK2 dependant on a function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1648-1652.
- FINAN, T.M.; KUNKEL, B; DE VOS, G.F. and SIGNER, E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* 167: 66-72.
- HARDY, R.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. and BURNS, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:185-207.
- HIRSCH, P.R. 1980. Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 116: 261-270.
- HYNES, M.F. and MC GREGOR, N.F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4: 567-574.
- HYNES, M.F.; QUANDT, J.O'CONNEL, P.O. and PUHLER, A. 1989. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Gene* 78: 111-120.
- HYNES, M.F.; SIMON, R. and PUHLER, A. 1985. The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. *Plasmid* 13: 99-105.
- HYNES, M.F.; SIMON, R.; MULLER, P.; NIEHAUS, K.; LABES, M. and PUHLER, A. 1986. The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.* 202: 356-362.
- JENSEN, H.L. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proc. Linn. Soc. Nsw.* 66: 98-108.
- MOËNNE-LECCOZ, Y.; BALDANI, J.I. and WEAVER, R.W. 1995. Sequential heat-curing of Tn5-mob-sac labelled plasmids from *Rhizobium* to obtain derivatives with various combinations of plasmids and no plasmid. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 175-179.
- MONZA, J.; FABIANO, E. and ARIAS, A. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24: 241-247.
- OLIVEIRA, L.A. and GRAHAM, P.H. 1990. Speed of nodulation and competitive ability among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 153: 311-315.
- PANKHURST, C.E.; BROUGHTON, W.J. and WIENEKE, U. 1983. Transfer of an indigenous plasmid of *Rhizobium loti* to other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 129:2535-2543.
- PANKHURST, C.E.; MAC DONALD, P.E. and REEVES, J.M. 1986. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2321-2328.
- PUGSLEY, A.P. and OUDEGA, B. 1987. Methods for studying colicins and their plasmids. In: *Plasmids, A practical approach*. Ed. K.G. Hardy. IRL Press, Oxford. pp. 105-108.
- RIGAUD, J. and PUPPO, A. 1975. Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *Gen. J. Microbiol.* 88:223-228.
- ROSEMBERG, C.;BOISTARD, P.; DENARIE, J. and CASSE-DELBART, F.(1981). Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 185:326-333.
- SANJUAN, J. and 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. and OLIVARES, J. 1988. Study on pRMe GR4b, a non-symbiotic plasmid of *Rhizobium meliloti*. En: *Molecular Genetics in Plant-Microbe Interactions* APS PRESS. Ed. R. Palacios and D.P.S. Verna. St. Paul. Minnesota. USA.
- SCHUBERT, K.R. and EVANS, H.J. 1976. Hydrogen evolution a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 1207-1211.
- SIMON, R.; O'CONNELL, M.; LABES, M. and PUHLER, A. 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other Gram-negative bacteria. Ed. A. y H. Weissbach. A.P. En: *Methods in Enzimology*. Plant Molecular Biology. 118: 640-659.
- SIMON, R.; PRIEFER, U. and PUHLER, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *BioTechnology* 1: 784-791.
- TRIPLETT, E.W. 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Mol. Plant Microb. Inter.* 3: 199-206.
- VELASQUEZ, E.; MATEOS,P.F.; PEDRERO, P.; DAZZO, F.B. and MARTINEZ-MOLINA, E. 1995. Attenuation of symbiotic effectiveness by *Rhizobium meliloti* SAF22 related to the presence of a cryptic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2033-2036.
- VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 6.
- WATSON, R.J.; CHAN, Y.K.; WHEATCROFT, R.; YANG, A.F. and HAN, S. 1988. *Rhizobium meliloti* genes required for C₄-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *J. Bacteriol.* 170: 927-934.
- ZDOR, R.E. and PUEPPKE, S.G. 1988. Early infection and competition for nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1196-2002.