

Interacciones tempranas Rhizobio-leguminosa

PA BALATTI

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP/ CICBA
CC 327, La Plata 1900. Instituto de Fisiología Vegetal, INFIVE. E-mail: pbalatti@isis.unlp.edu.ar

RESUMEN

La simbiosis rizobio-leguminosa es la que más se ha estudiado en el mundo. Uno de los aspectos más interesantes de esta simbiosis es la especificidad. El objetivo de este trabajo es describir a nivel molecular la secuencia de pasos que se suceden, cuando una planta es colonizada e infectada por bacterias del género *Rhizobium*, *Azorhizobium* o *Bradyrhizobium*. Los flavonoides de las plantas (metabolitos secundarios), inducen la expresión de genes comunes de nodulación *nodABC*, a través de su interacción con la proteína NodD. Esta interacción da lugar a la síntesis de moléculas, los factores de nodulación. La expresión de los genes de especificidad dan lugar a la decoración de esta molécula central y con ello cambian su capacidad biológica.

Early steps of the rhizobia-legume interaction

SUMMARY

The rhizobia-legume symbiosis is one of the biological systems of the world that have been more intensely studied and one of the most striking characteristic of it is specificity. Here I describe at the molecular level the succession of events that occurred while a plant is being colonized and infected with bacteria, from the genus *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium*. Flavonoids, secondary metabolites excreted by the plant root interact with NodD, and this interaction results in the expression of the common nodulation genes *nodABC*. Resulting this, in the synthesis of the core molecule of nod factors. Host specificity genes expression introduce decoration to the core molecule, and this provoked an alteration on the biological activity of the molecules.

Recibido el 4 de junio de 1996. Aceptado el 15 de agosto de 1996.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es el nutriente que con mayor frecuencia limita el rendimiento de los cultivos. En muchos organismos, tanto procariontas como eucariotas, el crecimiento es limitado por la cantidad de nitrógeno disponible en el ambiente y por la habilidad de los organismos, para metabolizar las diferentes formas en que encuentran el nitrógeno. El 80 % de la atmósfera de la tierra es nitrógeno molecular (N_2) que no está disponible para las plantas debido a que ellas sólo pueden utilizarlo en sus formas reducidas, al estado de nitrato o de amonio. La reducción del N_2 a las formas inorgánicas se conoce como fijación de nitrógeno. En el proceso industrial de fijación de nitrógeno, el elemento es reducido a alta temperatura y presión. Pero el nitrógeno también puede ser reducido en la naturaleza, por medio de bacterias libres o por asociaciones planta-bacteria y a esto se lo denomina Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN). La FBN es responsable de la incorporación al suelo de 170 millones de toneladas de N por año, lo que constituye, aproximadamente, el 50% del total de N fijado por año en el mundo. Es por ello que la FBN es una alternativa económica, para reemplazar a los fertilizantes nitrogenados en suelos con bajos niveles de N.

Las plantas que pertenecen a la familia Leguminosae (Fabaceae) pueden establecer una asociación simbiótica con bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* o *Azorhizobium*. La bacteria invade la raíz de la planta (o el tallo en el caso de *Azorhizobium*) e induce el desarrollo de un nódulo, estructura en la que una enzima bacteriana, la nitrogenasa, reduce el nitrógeno molecular a amonio, el cual es transportado por el sistema vascular de la planta. Los primeros reportes sobre la presencia de nódulos en las plantas datan del siglo XVI. Dalechamps en la Historia Generalis Plantarum describe una especie del género *Ornithopodium* la que habitual-

mente presenta nódulos (Fred *et al.*, 1932). El concepto sobre la naturaleza y función de los nódulos sufrió una evolución desde Dalechamps y distintas teorías trataron de explicar el rol de estas estructuras tal cual lo describe Fred *et al.* (1932). Recién en 1887/88 se encontró que los nódulos eran el resultado de la asociación entre bacterias y plantas. En 1887, Beijerinck aisló la bacteria y en 1888, Ward comprobó que la formación de los nódulos era el resultado de la acción de una bacteria (Fred *et al.*, 1932). Casi simultáneamente, Hellriegel y Wilfarth (citado por Burris y Roberts, 1993) presentaron evidencias convincentes del proceso de fijación de N_2 en plantas leguminosas y localizaron el proceso, en los nódulos de las raíces de plantas de arveja.

Desde el momento en que se hicieron esas observaciones muchos investigadores han trabajado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y así esta se convirtió en la interacción planta microorganismo más estudiada. La familia Leguminosae, no sólo es la tercera familia en importancia de las angiospermas, sino que también incluye cultivos de gran interés económico (Polhill y Raven, 1978). Desde un punto de vista morfológico y ecológico, las leguminosas comprende un grupo de especies muy diverso, con una variación que va desde especies árticas de ciclo anual hasta árboles tropicales, todas ellas noduladas por rizobios (Young y Johnston, 1989). Sólo una planta no leguminosa del género *Parasponia*, desarrolla nódulos fijadores de nitrógeno con *Bradyrhizobium* (Trinick y Galbraith, 1980). Las evidencias indican que las leguminosas son una familia con características exclusivas y diferente del resto de los miembros del reino vegetal. Prueba de esto, es que recientemente se encontró que cultivos axénicos de alfalfa y trébol desarrollaron estructuras similares a los nódulos. Esto estaría indicando la existencia de una serie de eventos preprogramados en la planta (Truchet *et al.*, 1989; Blauenfeldt *et al.*, 1994).

Bradyrhizobium, *Rhizobium* y *Azorhizobium*

pertenecen a la familia *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984). Estos organismos son bacterias Gram-negativas, con formas de bastones que pueden ser pleomórficas bajo condiciones ambientales adversas y que sintetizan ácido polib-hidroxibutírico. La mayoría de las bacterias de esta familia inducen hipertrofias corticales en las plantas y contienen plásmidos, elementos extracromosómicos con replicación autónoma de la del cromosoma. Los plásmidos pueden conferirle a las bacterias características fenotípicas como la resistencia a metales pesados, antibióticos, etc. Los rizobios se encuentran en el suelo viviendo como saprófitos y algunas estirpes pueden fijar nitrógeno, tanto en simbiosis como en forma libre.

Uno de los aspectos más intrigantes de la simbiosis rizobio-leguminosa es la especificidad. Algunos rizobios infectan y desarrollan nódulos sólo en una o dos especies hospedantes, mientras que otros nodulan muchas y diversas especies de leguminosas. Esta interacción es específica, puesto que una estirpe de rizobio puede infectar y nodular sólo un limitado número de hospedantes. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodula casi exclusivamente especies de los géneros *Vicia* y *Pisum*, pero *Rhizobium* sp. NGR234 puede nodular cerca de 200 especies distintas de leguminosas (Pueppke y Broughton, 1995). Las plantas que son noduladas por la misma especie de rizobio se clasificaron en grupos llamados de inoculación cruzada (cross-inoculation groups), los que fueron definidos en 1932 por Fred *et al.* (1932). La importancia del concepto de los grupos de inoculación cruzada ha ido perdiendo importancia por dos motivos. En primer lugar, la nodulación y fijación de nitrógeno esta mediada por los plásmidos simbióticos, los que pueden ser transferidos a otros organismos. En segundo lugar, se encontró que otras leguminosas, además de las esperadas, pueden ser noduladas por ciertos rizobios.

La clasificación de los rizobios cambia constantemente no sólo debido a la disponi-

bilidad de nuevas metodologías para la clasificación, sino también debido al aislamiento de nuevas especies. En la Tabla 1 se presenta una aproximación de su clasificación.

Las bacterias del género *Rhizobium* tienen plásmidos que llevan los genes de nodulación (*nod* /*nod*) y de fijación de nitrógeno (*nif*). Son bacterias de crecimiento rápido (2-4 h de tiempo de generación). Las colonias que forman son circulares y convexas, semitraslúcidas y mucilaginosas, usualmente alcanzan 2-4 mm en aproximadamente 3-5 días en el medio extracto de levadura-manitol-agar (EMA). Generan una reacción ácida en medio EMA. Las células son móviles por un flagelo polar o subpolar o a través de dos a seis flagelos peritricos. El concepto de *biovar* se creó debido a que bacterias como *R. meliloti*, *R. phaseoli* y *R. leguminosarum* son casi idénticas excepto por el hospedante que infectan.

Las bacterias del género *Bradyrhizobium* tienen los genes *nod* /*nod* y *nif* en el cromosoma. Las colonias que desarrollan son circulares, opacas, convexas y raramente traslúcidas. Se movilizan por medio de un flagelo polar o subpolar. Las colonias no exceden 1 mm de diámetro, luego de 5-7 días de crecimiento en medio EMA. En este mismo medio líquido producen una reacción alcalina y nodulan preferentemente leguminosas tropicales.

Las bacterias del género *Azorhizobium* son de crecimiento rápido y tienen los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, ubicados en el cromosoma. Las células son móviles y presentan flagelos peritricos en medio sólido y un solo flagelo lateral en medio líquido. Las colonias son circulares y tienen un color cremoso. Usualmente tienen 2-4 mm de diámetro después de 3-5 días de desarrollo en el medio EMA. Generan una reacción ácida en el medio de crecimiento. *Azorhizobium* fija nitrógeno en forma libre de la misma forma que *Bradyrhizobium* y crece bien en medios libres de nitrógeno. Estos organismos inducen la formación de nódulos tanto en los

Tabla 1. Géneros de rizobios y sus hospedantes simbióticos.
Rhizobia genera and their symbiotic hosts.

Género	Leguminosas Hospedantes
Rhizobium	
<i>R. leguminosarum</i>	
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> sp.
biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Lens culinaris</i> <i>Vicia</i> sp.
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> sp.
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Melilotus alba</i> , <i>Trigonella</i> sp.
<i>R. loti</i>	<i>Lotus</i> sp.
<i>R. fredii</i>	<i>Glycine</i> sp. y otros
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i> sp., <i>Leucaena leucocephala</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i> sp.
<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i> sp.
<i>R. sp.</i> NGR234	<i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Leucena leucocephala</i> , <i>Vigna</i> sp.
<i>Rhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Rhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna</i> sp., <i>Lupinus</i> sp. y otros
Azorhizobium	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> sp.

tallos como en las raíces de plantas del género *Sesbania*.

Metabolitos Secundarios de las plantas: flavonoides

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se desarrolla a través de una compleja y ordenada serie de eventos, lo que sugiere el intercambio de señales entre el hospedante y el simbiote. Innes *et al.* (1985), Mulligan y Long (1985), Rossen *et al.* (1985) y Shearman *et al.* (1986) observaron que la transcripción de los genes de nodulación se activaba varias veces, cuando los rizobios se exponían a compuestos de bajo peso molecular que están pre-

sentes en los exudados de semillas y raíces. Peters *et al.* (1986) y Redmon *et al.* (1986) respectivamente, encontraron que los compuestos inductores eran Luteolina y Apigenina para *Rhizobium meliloti* y 7,4-dihydroxiflavona para *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Estos compuestos son flavonoides producidos por las plantas. Son una clase de metabolitos secundarios comunes en todas las plantas superiores (Koes *et al.*, 1994). Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen dos anillos aromáticos unidos por un C3, el que también forma una anillo en la estructura final. Basados en el grado de oxidación de la unidad C3 y en la posición del anillo, los flavonoides se dividen en subclases como flavonoles, flavononas e isoflavonoides. Cada

una de estas moléculas puede sufrir modificaciones como hidroxilaciones, metilaciones, etc., resultando así en una gran cantidad de compuestos con diversa actividad biológica (Koes *et al.*, 1994). Los exudados de las plantas contienen diferentes flavonoides (Zaat *et al.*, 1988) y mientras algunos inducen los genes *nod*, otros reprimen la expresión de estos genes (Firmin *et al.*, 1986; Djordjevic *et al.*, 1987).

Genética de la Nodulación

Los estudios genéticos y moleculares llevaron a la identificación de los genes de nodulación (*nol/nod*) y de fijación de nitrógeno (*fix* and *nif*) genes. Los genes de nodulación *nod* y *nol* se han agrupado de acuerdo a la función que cumplen. Un grupo estaría formado por los alelos *nodD*, que codifican proteínas reguladoras. El segundo grupo es el de genes comunes de nodulación. Estos están estructuralmente y funcionalmente conservados en los rizobios y, por lo tanto, son intercambiables entre las especies sin alterar la amplitud de especies hospedantes (Martinez *et al.*, 1990). La inactivación de los genes comunes de inoculación hace que la bacteria no pueda inducir la formación de nódulos. El tercer grupo incluye a los genes de especificidad. Estos genes no están estructuralmente conservados o si lo están, no son funcionalmente equivalentes. Estos especifican el conjunto de plantas leguminosas en las que los rizobios pueden formar nódulos (Djordjevic y Weinman, 1991).

nodD

El gen *nodD* se expresa constitutivamente (Rossen *et al.*, 1985; Hovarth *et al.*, 1987). Inicialmente se consideró un gen común de nodulación porque fue posible realizar complementación entre diversas especies de

rizobios (Djordjevic *et al.*, 1985; Bassam *et al.*, 1986; Hovarth *et al.*, 1987). A pesar de existir excepciones, el gen *nodD1* de *R. meliloti* no complementó un mutante *nodD* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, y sólo lo hizo en forma parcial en un mutante de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Spaink *et al.*, 1987). En algunos rizobios como *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii* existe sólo una copia del gen *nodD* (Györgypal *et al.*, 1991). Recientemente, se demostró que algunas estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tienen dos copias del gen *nodD* (Rodríguez-Quifones *et al.*, 1989; Lewis-Henderson y Djordjevic, 1991a). Otros rizobios como *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium fredii* también tienen dos copias del gen *nodD* (Appelbaum *et al.*, 1988; Göttfert *et al.*, 1992), *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tiene tres copias de *nodD* (Davis and Johnston, 1990). *Rhizobium meliloti* tiene tres copias de *nodD* y *syrm*. Este es un activador de la transcripción altamente homólogo a *nodD*, el que también se ha encontrado en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Göttfert *et al.*, 1986; Rodríguez-Quifones *et al.*, 1987; Barnett y Long, 1990; Michiels *et al.*, 1993). *Azorhizobium caulinodans* cepa ORS571 tiene sólo una copia funcional del gen *nodD* (Goethals *et al.*, 1990). Recientemente, se describió en *Rhizobium tropici* la existencia de cinco fragmentos de DNA homólogos a *nodD* (van Rhijn *et al.*, 1993).

La expresión del gen *nodD* está bajo una estricta regulación, aunque a excepción de *Bradyrhizobium japonicum*, se expresa constitutivamente (Rossen *et al.*, 1985; Hovarth *et al.*, 1987). Los alelos de *nodD* están sujetos a distintos tipos de regulación de su expresión, no solo entre cepas de una misma especie sino también entre especies de *Rhizobium*. La luteolina, un flavonoide que está presente en los extractos de semilla de alfalfa (Peters *et al.*, 1986), activa sólo el gen *nodD1* de *R. meliloti* (Phillips, 1992). Las betaínas producidas por la raíz de plantas de alfalfa, como la trigonelina y stachidrina, inducen sólo

nodD2 (Phillips, 1992). Otro compuesto presente en exudados radicales de alfalfa, 4,4 dihidroxi-2-metoxichalcone, activa la transcripción de *nodD1* y *nodD2* (Phillips, 1992). En *R. meliloti* la expresión de *nodD3* depende de una proteína activadora SyrM (Swanson *et al.*, 1993), y la expresión de *nodD1* depende en algunas cepas como AK631 de una proteína represora (Kondorosi *et al.*, 1989). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodD* autoregula su expresión (Rossen *et al.*, 1985). En *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizobium* sp. BR816 se encontraron cinco y cuatro copias de *nodD* respectivamente (van Rhijn *et al.*, 1994a; 1994b). En *R. tropici* CIAT899 sólo *nodD1* y en un nivel aún menor, *nodD3*, son proteínas activadoras de la transcripción de los genes de nodulación, que responden a la inducción con flavonoides (van Rhijn *et al.*, 1994). Más aún, un mutante *nodD* de *Rhizobium* sp. NGR234, que es *nod* en *Leucaena leucocephala*, *Macroptilum atropurpureum* y *Phaseolus vulgaris*, fue complementado y pudo nodular las tres especies, sólo con el gen *nodD1* proveniente de *R. tropici*. La complementación del mismo mutante con *nodD3* y *nodD5* resultó en un fenotipo nodulante sólo con *Phaseolus vulgaris* (van Rhijn *et al.*, 1994a). En *Rhizobium* sp. BR816, los cuatro genes *nodD* difieren en su respuesta a los flavonoides y cada uno complementó al mutante de NGR234 *nodD1*, en al menos una de tres especies hospedantes (van Rhijn *et al.*, 1994b). Estas evidencias sugieren que la especificidad de las cepas CIAT890 y BR816 está bajo un estricto control, a través de copias múltiples de *nodD*. Esto es un escenario similar al de *R. meliloti*, bacteria que también lleva copias múltiples de *nodD*.

El producto del gen *nodD* ha sido clasificado sobre la base de la homología y a la retención de la estructura hélice-giro-hélice (Schell, 1993). Es una proteína tipo Lys R. Estas moléculas reguladoras del tipo LysR tienen ciertas propiedades comunes que se pueden sintetizar como sigue:

a) codifican una proteína activadora de la transcripción de respuesta coinducida, con tamaños que van de los 276 a 324 aminoácidos; b) se unen a ciertas secuencias del DNA con posiciones y motivos estructurales similares; c) cada una de estas proteínas se transcribe en forma divergente del promotor o a veces se solapa con el promotor del gen que regulan; d) la capacidad de cubrir un sector de DNA en el que se solapan dos promotores divergentes les permite regular la expresión bidireccional de genes (Beck and Warren, 1988); e) usualmente la transcripción del gen regulado es activada sólo ante la presencia de moléculas-señales pequeñas que actúan de coinductor; f) la región amino terminal está conservada mientras que la región C-terminal diverge; g) todas estas proteínas presentan una conformación hélice-giro-hélice en la región amino terminal; h) análisis de footprinting (impresiones de contacto) sugieren que estas proteínas se unen al DNA en ausencia de la molécula inductora (Schlaman *et al.*, 1992; Schell, 1993).

La proteína NodD interactúa de una manera aún desconocida con las moléculas-señales producidas por las plantas (usualmente flavonoides aunque algunas veces también lo hace con otras moléculas) y activan la expresión de los genes *nod* y *nol*. Se ha encontrado que la sensibilidad de la proteína NodD a distintas señales correlaciona con un estrecho o amplio número de especies hospedantes de los rizobios (Horvath *et al.*, 1987; Spaink *et al.*, 1987; Györgypal *et al.*, 1991). Recientemente, Sousa *et al.* (1993) demostraron que un fragmento de DNA de *R. tropici* que lleva la mitad amino terminal del gen *nodD* y una secuencia homóloga a la *nod*-box, extiende el número de hospedantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseli* y bv. *trifolii* a plantas normalmente noduladas por *R. tropici*. Más aún, los alelos de *nodD* de *R. meliloti* tienen funciones comunes de actividad promotora, pero difieren en la habilidad para reconocer los flavonoides inductores (ver párrafo anterior) (Györgypal

et al., 1988; Phillips, 1992). Algunas evidencias indirectas sugieren que la parte C-terminal de NodD debe interactuar con las señales de las plantas. La mayoría de los aminoácidos que varían en la proteína NodD se encuentran ubicados en la región C-terminal (Horvath *et al.*, 1987; Appelbaum *et al.*, 1988). El reemplazo de la porción C-terminal del gen *nodD* de MPKI3030, una cepa derivada de NGR234, con la correspondiente porción del gen *nodD1* de *R. meliloti* resultó en un reconocimiento y rango de hospedantes típico de *R. meliloti* (Horvath *et al.*, 1987). La mayoría de las alteraciones que afectan la habilidad de NodD de reconocer determinados flavonoides inductores se ubican por detrás del aminoácido 132 (Burn *et al.*, 1989; McIver *et al.*, 1989; Spaink *et al.*, 1989b).

La secuencia conservada *nod*-box

NodD se une a una secuencia conservada de ácido desoxirribonucleico (ADN) llamada *nod*-box. Este fragmento de ADN es de aproximadamente 50 pares de bases y se encuentra marcadamente conservado en la región 5'. Esta región precede a la mayoría de los operones de nodulación (Rostas *et al.*, 1986; Schofield y Watson, 1986; Shearman *et al.*, 1986; Spaink *et al.*, 1987). Algunos genes que dependen del gen *nodD1* no presentan la región conservada *nod*-box (Sadowsky *et al.*, 1988; Meinhardt *et al.*, 1993; Boundy-Mills *et al.*, 1994). La estructura de la secuencia *nod*-box aún se halla en discusión y se han propuesto tres modelos diferentes. Rostas *et al.* (1986) propusieron que una secuencia de aproximadamente 50 pares de bases es importante para la expresión de los genes de nodulación (*nod*) e identificaron, tres motivos altamente conservados de 5, 7 y 25 pares de bases. Los otros dos modelos de la secuencia *nod*-box son modulares. Un modelo está compuesto de dos módulos de 9 pares de bases repetidos (Wang y Stacey, 1991)

y el otro está compuesto por estructuras que se repiten en forma inversa (Goethals *et al.*, 1992). Se han descrito unos pocos genes en los que la secuencia *nod*-box se encuentra ausente, pero que aún así, responden a la inducción con flavonoides. Estos son un locus no caracterizado de NGR234 que está ligado al gen *nodD* (Bassam *et al.*, 1988); El gen *nolA* de *Bradyrhizobium japonicum*, que es un regulador positivo de la nodulación de cultivos de soja (Sadowsky *et al.*, 1991) y el locus *nolXWBTUV*, que determina especificidad a nivel de cultivos de soja en *R. fredii* USDA257 (Meinhardt *et al.*, 1993) y *nolJ* de *R. fredii* (Boundy-Mills *et al.*, 1994). El hecho de que existan distintos arreglos de los motivos conservados de la secuencia *nod*-box y la ausencia de la secuencia *nod*-box en genes que responden a la interacción NodD-flavonoides, sugieren la existencia de otros activadores de la transcripción que pueden interactuar con NodD o con secuencias del DNA anteriores a los genes *nod*, o que la proteína NodD puede reconocer otras secuencias del DNA.

NodD se une a la secuencia *nod*-box como un dímero o como multímero en distintos sitios de la misma cara de la hélice tanto en presencia como en ausencia de flavonoides (Hong *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1988; Kondorosi *et al.*, 1989; Fisher y Long, 1993) de la misma manera que otras proteínas reguladoras LysR. Los flavonoides interactúan con NodD y la interacción induce un cambio en la conformación del DNA que facilita la transcripción de los genes *nod* y *nol* (Fisher y Long, 1993).

nodABC: los genes comunes de nodulación

Los genes comunes de nodulación *nodABC* han sido hallados en todas las estirpes de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* aislados hasta el momento (Martinez *et al.*, 1990). La inactivación de los genes

nodABC, elimina la habilidad de la bacteria de producir cualquier interacción simbiótica con la planta. Es decir, enlramiento del pelo radical (Hac⁻), divisiones corticales (Noi⁻) y formación de nódulos (Nod⁻) (Long, 1989). Estos genes, están estructuralmente conservados y en todos los casos son funcionalmente intercambiables entre especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Martinez *et al.*, 1990). En *R. meliloti* y en *R. leguminosarum* los genes *nodABC* forman parte de un operón y están ligados al gen *nodD1* (Rossen *et al.*, 1984; Shearman *et al.*, 1986). En otros rizobios como *Rhizobium* sp. NGR234 y *R. fredii*, el locus *nodD* no está ligado a *nodABC* (Bachem *et al.*, 1985; Krishnan y Pueppke, 1991a). En otros rizobios como *R. etli* y *R. loti* los genes *nodABC* se encuentran en distintas unidades de transcripción (Vazquez *et al.*, 1991; Denarié y Roche, 1992).

Genes de especificidad

Los genes de nodulación son considerados de especificidad (*hsn*) cuando:

a) la inactivación del gen no puede ser complementada con DNA de otras especies de *Rhizobium*.

b) la inactivación del gen resulta en un cambio de la amplitud de hospedantes

c) el gen puede extender el número de hospedantes de una especie de *Rhizobium* en la que ha sido movilizada, hasta incluir plantas que son noduladas por la especie donante del gen (Denarié *et al.*, 1992).

Los genes de especificidad fueron identificados de distintas maneras: a) por eliminación de trozos de DNA del genoma de la bacteria (Djordjevic *et al.*, 1986); b) por medio de la movilización de los cósmidos de una librería genética de una bacteria con gran amplitud de hospedantes, a otra especie de estrecho. Algunos genes de especificidad tienen la propiedad de extender el número de especies hospedantes hasta incluir cultivares o espe-

cies incompatibles con la cepa de rizobio utilizada. El gen *noIA* hace posible que aislamientos del serogrupo 123 de *Bradyrhizobium japonicum* nodulen plantas de soja, que normalmente no son compatibles con especies de este serogrupo (Sadowsky *et al.*, 1991). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* la presencia de un gen, *noIX*, asegura la nodulación de cultivares antiguos de arveja como Afganistán (Davis *et al.*, 1988). El gen *nodM* de *R. Leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 reprime la nodulación en el trébol subterráneo cv Woonnellup (Lewis-Henderson and Djordjevic, 1991a). En *R. leguminosarum* bv. *trifolii* otro gen, *nodT*, puede extender la capacidad de nodulación de la cepa TA1 en el cv Woonnellup de trébol subterráneo. (Lewis-Henderson and Djordjevic, 1991b). En *R. fredii* se identificó el locus *noIXWBTUV* que regula la nodulación en cultivares de soja (Heron *et al.*, 1989; Balatti y Pueppke, 1990; 1992a; 1992b; Meinhardt *et al.*, 1993). Debido al papel que juegan los genes de especificidad en la síntesis de los factores de nodulación, la mayoría de ellos y sus fenotipos se describen en la sección de factores de nodulación.

Un gen encontrado en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *nodO*, no se ajusta al modelo del resto de los genes de nodulación. Es decir, no induce modificaciones en los factores de nodulación tal cual lo sugirieron Denarié y Cullimore (1993). La inactivación del gen resulta en una nodulación demorada (Downie y Surin, 1990). Este gen, *nodO*, codifica una proteína que liga Ca²⁺ y que es secretada al medio de cultivo, a "posteriori" de la inducción de la bacteria con flavonoides (de Maagd *et al.*, 1989; Economou *et al.*, 1990). La secuencia de la proteína NodO tiene cierta homología con la hemoisina y algunas proteasas (Economou *et al.*, 1990) y comparte el mismo mecanismo de secreción de las mismas (PtrB) en *Erwinia chrysanthemi* (Scheu *et al.*, 1992). Recientemente se encontró que NodO media el flujo de iones a través de la membrana de la misma manera que la

haemolisina (Sutton *et al.*, 1992).

En resumen, la especificidad de las cepas de *Rhizobium* parece estar bajo un delicado mecanismo de regulación con tres niveles de control. Un primer nivel de regulación en la interacción NodD-flavonoide. Un segundo orden de control que determina la amplitud de especies hospedantes y que esta regulado por los genes de especificidad, y un tercer nivel en la regulación de la nodulación de cultivares pertenecientes a una misma especie.

Factores de Nodulación

Desde que Hiltner (ver Denarié y Roche, 1992) relató que los sobrenadantes filtrados de *Pisum sativum* contenían una substancia que inducía la iniciación de la infección (Hai) o la deformación (Had) del pelo radical, se desarrolló el concepto de la existencia de un componente extracelular de la bacteria que producía la deformación de los pelos radiculares (Yao and Vincent, 1969; Solheim y Raa, 1973; Dénarié y Roche, 1992). Más recientemente, Bauer *et al.*, (1985) encontraron evidencias de que las bacterias intercambiaban información con la planta, a través de moléculas que difunden a través de filtros. Ellos demostraron que los rizobios inducían divisiones celulares subepidérmicas en la corteza de las células de plantas hospedante y no hospedantes, a pesar de que las bacterias no estaban en contacto con los tejidos superficiales de la raíz.

Van Brussel *et al.*, (1982) observaron que las cepas de *R. leguminosarum* provocaban la deformación del sistema radical, lo que se conoce como fenotipo raíz engrosada y corta (thick and short roots= TSR), en *Vicia sativa* subsp. *nigra*. Mientras analizaban el papel del *Rhizobium* en el proceso, encontraron que el sobrenadante estéril de bacterias crecidas en presencia de exudados de plantas tenía actividad TSR y, además, que los rizobios de-

bían tener los genes *nodABC* (Canter-Cremers *et al.*, 1986; Van Brussel *et al.*, 1986). Esta observación llevó al descubrimiento de ciertos metabolitos que se denominaron factores de nodulación y, consecuentemente, a elucidar el papel de los genes comunes de nodulación *nodABC* en la nodulación.

Lerouge *et al.* (1990) construyeron una cepa de *Rhizobium meliloti* con copias de los genes *nodABC* y de esta manera les fue posible aislar y estudiar la estructura de los factores de nodulación producidos por *R. meliloti*. Posteriormente se aislaron y estudiaron los factores de nodulación de diferentes especies de rizobios como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Estos metabolitos tienen una estructura básica común, formada por trímeros, tetrámeros o pentámeros, con enlace b1-4 de D-glucosamina mono *N*-acetilada en el azúcar no reductor de la molécula (Roche *et al.*, 1991; Spaink *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1992; Sanjuan *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 1992; Mergaert *et al.*, 1993; Poupot *et al.*, 1993; Bec-Ferté *et al.*, 1994). Las diferencias entre las especies se reflejan en cambios en la decoración de la molécula central. La nomenclatura de los factores de nodulación es de la siguiente manera p. ej. NodRf V (C18:1; Me-Fuc) Nod indica factor de nodulación, Rf indica *Rhizobium fredii*; V, indica el número de residuos de *N*-acetilglucosamina; C18:1 representa la longitud de la cadena del ácido graso y el número de doble ligaduras; Me-Fuc describe que tipo de molécula esta unida al esqueleto central, en este caso metil-fucosa. En *R. meliloti*, los factores de nodulación NodRm tienen un grupo sulfato en el amino-azúcar reductor terminal. Están *N*-acilados por ácidos grasos no saturados o por una serie de ácidos grasos hidroxilados en el amino azúcar terminal no reductor. En *R. leguminosarum* bv *viciae* el factor NodRIV no es sulfatado, pero son *N*-acilados por ácido vacénico (C18:1) o por un ácido no saturado (C18:4) (Spaink *et al.*, 1991). En *R. fredii* el factor de nodulación tiene un grupo metil fucosa adherido al extremo

reductor del oligómero del esqueleto de quitina y está *N*-acilado por ácido vacénico (C18:1) (Bec-Ferté *et al.*, 1994). NodRV (C18:1; MeFuc) de *R. fredii* USDA257 es idéntico a NodBj (C18:1; MeFuc) único factor de nodulación producido por *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. NodRV (C18:1; MeFuc) es también idéntico a NodBeV (C18:1; MeFuc) uno de los dos compuestos sintetizados por *B. elkanii* USDA61 (Sanjuan *et al.*, 1992; Carlson *et al.*, 1993). Todos estos factores de nodulación son inducidos por genisteína, un flavonoide que esta presente en los exudados radicales de soja. *R. fredii*, *B. japonicum* y *B. elkanii* pueden inducir nódulos normales fijadores de nitrógeno en soja y las tres cepas producen el mismo factor de nodulación. Esto sugiere que el factor de nodulación juega un papel común en el mismo hospedante. Más aún, es realmente intrigante que *Rhizobium* sp. NGR234, una estirpe que no puede formar nódulos fijadores de nitrógeno en soja, produzca un conjunto de factores de nodulación pero ninguno de ellos idéntico a NodRV (C18:1; MeFuc) (Price *et al.*, 1992). El significado biológico de esto es desconocido. Pero recientemente, Relic *et al.* (1994) coinocularon *R. fredii* con factores de nodulación de la cepa NGR234, una cepa que normalmente nodula *Calopogonium caeruleum*, extendiendo el rango de hospedantes de *R. fredii* USDAS257 a *C. caeruleum*.

Recientemente se ha aclarado el papel de los genes en la síntesis de los factores de nodulación. Se ha descrito que la proteína NodC es una *N*-cetilglucosamina transferasa (Geremia *et al.*, 1994; Spaink *et al.*, 1994). NodB está involucrado en la desacetilación del quitooligosacárido (John *et al.*, 1993; Atkinson *et al.*, 1994; Spaink *et al.*, 1994) y que NodA está involucrada en la *N*-acilación del esqueleto quitooligosacárido (Atkinson *et al.*, 1994; Rohrig *et al.*, 1994). Relic *et al.* (1994) confirmaron el papel de los genes *nodABC*, complementando un mutante *nodABC* de *R. sp.* NGR234 con factores de nodulación, permi-

tiendo esto la formación de nódulos en cowpea.

Los metabolitos de nodulación se consideran determinantes claves de la especificidad del hospedante, puesto que se ha encontrado que varios genes de especificidad codifican para su síntesis. En *Bradyrhizobium japonicum*, *nodZ*, un gen que le permite a la bacteria nodular siratro (*Macroptilum atropurpurea* L.), codifica una proteína requerida para que se produzca la adición de la 2-O-metil fucosa al extremo reductor terminal de la *N*-acetilglucosamina del factor de nodulación (Stacey *et al.*, 1994). Otro gen de *Bradyrhizobium*, que es cotranscripto con *nodABCSUIJ*, *noIO*, interviene en la fucosilación del esqueleto del factor de nodulación, a pesar de que el fenotipo de los mutantes *noIO* es sólo un desarrollo de nódulos más lento (Luka *et al.*, 1991).

En *R. leguminosarum* bv. *viciae*, el gen de especificidad *nodE* perteneciente al operon *nodFEL*, es el principal factor que determina la especificidad característica de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *trifolii* (Spaink *et al.*, 1989). *nodE* y *nodL* codifican proteínas involucradas en la síntesis de los factores de nodulación. NodL determina un sustituyente O-acetilo y NodE, un ácido graso no saturado C18:4. Recientemente, Bloemerg *et al.* (1994) purificó la proteína NodL, desarrolló anticuerpos contra ella y localizó a la misma en el citosol de la célula. Extractos proteicos purificados de NodL acetilaron lipoligosacáridos, fragmentos de quitina y *N*-acetilglucosamina, sugiriendo que, in vitro, NodL tiene una acción transacetiladora. *nodX*, un gen requerido por los rizobios, para evitar la resistencia que las plantas de arveja del cultivar Afghanistan oponen a la infección por cepas de rizobios europeas. Se ha encontrado que este gen media en la O-acetilación del factor de nodulación aunque de manera diferente a la inducida por NodL. Más aún, *nodX* reduce la producción de factores de nodulación, en aproximadamente, 95% (Firmin *et al.*, 1993).

En *R. meliloti*, mutaciones inducidas en el gen *nodH* habilitan a la bacteria para inducir el enrollamiento del pelo radical (HAC), el desarrollo de hilo infectivo (Inf) y la formación de nódulos en el hospedante no homólogo, *Vicia sativa* subsp *nigra* (Debellé *et al.*, 1986; Faucher *et al.*, 1988), pero no en el hospedante habitual, alfalfa (*Medicago sativa*). Sin embargo, la historia del gen *nodH* aún no es clara, debido a que mutantes de *nodH* pueden formar nódulos en alfalfa cuando las plantas son cultivadas en vermiculita (Ogawa *et al.*, 1991). Los mutantes de *R. meliloti nodQ* exhiben un número de hospedantes ampliado, nodulando tanto alfalfa como *Vicia sativa* subsp *nigra* (Cervantes *et al.*, 1989; Faucher *et al.*, 1989). Se ha encontrado que los genes *nodH* y *nodPQ*, codifican proteínas que determinan la amplitud de hospedantes, determinando la adición de un grupo sulfato al factor de nodulación (Schwedock and Long, 1989, 1990; Roche *et al.*, 1991).

Los genes *nodFE* están presentes en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *R. meliloti*. A pesar de que estos genes están conservados a nivel de la secuencia de bases en niveles superiores a los comunes de nodulación (Debellé and Sharma, 1986), no son funcionalmente equivalentes y son determinantes de la especificidad (Debellé and Sharma, 1986; Debellé *et al.*, 1988; Spaink *et al.*, 1989; Surin and Downie, 1989). Las bases moleculares de la variación alélica de los genes de especificidad *nodFE* entre *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* se ha estudiado hasta el punto de determinar que los dos alelos especifican la síntesis de ácidos grasos no saturados de diferente número de carbonos y también un número distinto de doble ligaduras (Demont *et al.*, 1993). *nodS*, otro gen que determina especificidad, le permite a la cepa de *R. sp.* NGR234 nodular *Leucaena leucephala* (Lewin *et al.*, 1990). Este gen ha sido identificado en *B. japonicum* (Gottfert *et al.*, 1990), en *R. fredii* USDA257, en donde no se expresa (Krishnan *et al.*, 1992), y en *Azorhizobium caulinodans*

(Geelen *et al.*, 1993). Recientemente, se ha sugerido que, *nodS*, codifica una proteína metiltransferasa, que podría estar involucrada en la síntesis de los factores de nodulación. Coincidiendo con esto, los factores de nodulación producidos por NGR234, pero no aquellos sintetizados por USDA257, tienen un grupo *N*-metilo (Price *et al.*, 1992; Bec-Ferté *et al.*, 1994). Aún los genes reguladores de *R. meliloti nodD3* y *syrM* controlan la síntesis de metabolitos de nodulación, que están *N*-acilados por ácidos grasos hidroxilados. Esto último resulta interesante porque NodD3 y SyrM regulan las respuestas de las bacterias a las señales de las plantas en forma distinta que NodD1 y NodD2 (Györgypal *et al.*, 1988, 1991; Homma *et al.*, 1990).

Los metabolitos de nodulación pueden inducir un número de respuestas características. En concentraciones muy bajas pueden inducir la deformación y la ramificación de los pelos radicales (Lerouge *et al.*, 1990; Roche *et al.*, 1991; Spaink *et al.*, 1991). Se ha demostrado que los factores de nodulación producidos por los rizobios pueden inducir la deformación de los pelos radicales en forma inespecífica. A pesar de que los factores de nodulación de *R. meliloti*, *R. leguminosarum* y *B. japonicum* pueden inducir la formación de meristemas en la corteza interna de las raíces de alfalfa y *Vicia* y en la corteza externa de plantas de soja, sólo los meristema inducidos por factores de nodulación provenientes de *R. meliloti* y *B. japonicum* pueden desarrollar con características anatómicas e histológicas de un nódulo normal inducido por *Rhizobium* (Truchet *et al.*, 1991; Stockermans y Peters, 1994).

Varias son las evidencias que sugieren que los factores de nodulación son compuestos morfogenéticos. La introducción, en un mutante de *R. meliloti* que carece de la región de los genes de nodulación, de uno (proveniente de *Agrobacterium tumefaciens*) que codifica la síntesis de citocininas, le permite a los transconjugantes inducir divisiones cor-

tales (Long y Cooper, 1988). Por otro lado, plantas transgénicas expresando los genes comunes de nodulación *nodA* y *nodB* muestran anomalías, indicando que las proteínas codificadas por estos dos genes encontraron el sustrato que les permitió sintetizar factores de crecimiento. Estos experimentos también demuestran que las plantas poseen la cadena de transducción de señales que le permiten responder a la presencia de estas moléculas reguladoras (Schmidt *et al.*, 1993). Más aún, un embrión mutante somático de zanahoria incapaz de desarrollar, fue rescatado por la aplicación de factores de nodulación de *R. leguminosarum* bv. *viciae* los que promovieron la masa proembriónica y la formación globular del embrión (de Jong *et al.*, 1993).

La actividad morfogenética de los factores de nodulación es probable que sea la responsable de la inducción no específica del enrulamiento de los pelos radicales (Schultz *et al.*, 1992). Sin embargo, los metabolitos aún retienen cierta especificidad la que reside en las decoraciones del esqueleto central de N acetilglucosamina. Esto lo sugiere el hecho de que sólo los metabolitos de nodulación de *R. meliloti* y *B. japonicum* inducen la formación de nódulos en alfalfa y soja, respectivamente (Truchet *et al.*, 1989; Stokkermans and Peters, 1994).

CONCLUSIONES

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de los eventos tempranos que se suceden durante la infección de las leguminosas por los rizobios. Sin embargo, estos conocimientos no han resuelto los problemas que presenta la utilización de los inoculantes. Fundamentalmente, conocer por qué determinadas cepas son más eficientes que otras en interactuar con las plantas hospedantes y, en definitiva, en desarrollar nódulos. Probable-

mente esto se deba a que se ha descuidado el estudio de la planta, ya que a pesar de que se han descrito genes que se expresan sólo ante la presencia de rizobios, no se conoce la función de ellos.

Más aún, en estos momentos un gran énfasis se ha puesto sobre los factores de nodulación, siendo éstos quizás sólo un componente más del conjunto de señales que resultan en la inducción de nódulos fijadores de nitrógeno. Prueba de esto es que los factores de nodulación son inespecíficos en la inducción de deformación de los pelos radicales que, además, depende de la concentración del factor de nodulación aplicada.

A pesar de todos estos conocimientos básicos logrados nada se sabe sobre el mecanismo por el cual el rizobio penetra en el pelo radical y de la supuesta acción de una enzima hidrolítica. Nadie ha podido hasta el momento demostrarlo.

Es decir, de la misma manera que los organismos patógenos ejercen su acción a través de la acción conjunta de señales, compuestos o enzimas, es probable que los rizobios posean un conjunto de mecanismos que conducirán a una interacción rizobio-leguminosa compatible, es decir a la formación de nódulos.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo el Dr. Balatti recibió apoyo económico de la CICBA y de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP.

BIBLIOGRAFÍA

Appelbaum ER, DV Thompson, K Idler and N Chartrain (1988) *Rhizobium japonicum* USDA191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. Journal of Bacteriology. 170: 12-20.

- Atkinson EM., MM Palcio, O Hinds Gaul and SR Long. (1994) Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nod factors: Nod A is required for an *N*-acyltransferase. Proceedings of the National Academy of Science USA 91: 8418-8422.
- Bachem CWB, E Kondorosí, Z Banfalvi, B Horváth, A Kondorosí and J Schell. (1985) Identification and cloning of nodulation genes from the wide host range *Rhizobium* strain NGR234. Molecular General Genetics 199: 271-278.
- Balatti PA and SG Pueppke (1990) Nodulation of soybean by a transposon-mutant of *Rhizobium fredii* USDA257 is subject to competitive nodulation blocking by other rhizobia. Plant Physiology 94: 1276-1281.
- Balatti PA and SG Pueppke (1992a) Differential sensitivity of *Rhizobium fredii* to nodulation blocking on McCall soybean: nodulation rates and efficiency. Plant Physiology Biochemistry. 30: 193-199.
- Balatti PA and SG Pueppke (1992b) Identification of North American soybean lines that form nitrogen fixing nodules with *Rhizobium fredii* USDA257. Canadian Journal of Plant Science. 72: 49-55.
- Barnett MJ and SR Long (1990) DNA sequence and translational product of a new nodulating-regulatory locus: *syrm* has sequence similarity to NodD proteins. Journal of Bacteriology 172: 3695-3700.
- Bassam BJ, MA Djordjevic, J W Redmond, M Batley and BG Rolfe (1988) Identification of a *nodD*-dependent locus in the *Rhizobium* strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes. Molecular Plant Microbe Interactions 1: 161-168.
- Bauer WD, TV Bhuvaneshwari, HE Calvert, IJ Law, NSA Malik and SJ Vesper (1985) Recognition and infection by slow-growing rhizobia. In: Nitrogen fixation research progress. Evans H.J., Bottomley P.J. and W.E. Newton Eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht pp 247-53.
- Bec-Ferté MP, HB Krishnan, D Promé, A Savagnac, SG Pueppke and JC Promé (1994) Structures of nodulation factors from the nitrogen fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. Biochemistry 33: 11782-11788
- Beck CF and RAJ Warren (1988) Divergent promoters, a common form of gene organization. Microbiological Reviews. 52: 318-326.
- Blauenfeldt J, PA Joshi, PM Gresshoff and G Caetano-Anollés (1994) Nodulation of white clover (*Trifolium repens*) in the absence of *Rhizobium*. Protoplasma 179: 106-110.
- Bloemberg GV, JE Thomas-Oates, BJJ Lugtenberg and HP Spaink (1994) Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* O-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and *N*-acetylglucosamine in vitro. Molecular Microbiology 11: 793-804.
- Boundy-Mills KL, RM Kosslak, RE Tully, SG Pueppke, S Lohrke and MJ Sadowsky (1994) Induction of the *Rhizobium fredii nod*-box independent nodulation gene *nodJ* requires a functional *nodD* gene. Molecular Plant-Microbe Interactions 7: 305-308.
- Buendía-Clavería AM, F Temprano-Vera, F Echevarrieta Orive and JE Ruiz-Salnz (1989) *Rhizobium fredii*: Las bacterias de crecimiento rápido que forman nódulos fijadores de nitrógeno en la soja. Consejería de Agricultura y Pesca Junta de Andalucía. España. Comunicaciones Agrarias Serie Producción Vegetal N°6 140pp.
- Burn JE, WD Hamilton, JC Wootton and AWB Johnston (1989) Single and multiple mutations affecting properties of the regulatory *nodD* gene of *Rhizobium*. Molecular Microbiology 3: 1567-1577.
- Burris RH and GP Roberts (1993) Biological Nitrogen Fixation. Annual Review of Nutrition 13: 317-335.
- Canter-Cremers HCJ, AAN van Brussel, J Plazinski and BG Rolfe (1986) Sym plasmid and chromosomal gene products of *Rhizobium trifolii* elicit developmental responses on various legume roots. Journal of Plant Physiology 122: 25-40.
- Carlson RW, NPJ Price and G Stacey (1994) The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. Molecular Plant Microbe Interactions 7: 684-695.
- Cervantes E, S B Sharma, F Maillet, J Vasse, G Truchet and C Rosenberg (1989) The product of the host-specific *nodQ* gene of *Rhizobium meliloti* shares homology with translation, elongation and initiation factors. Molecular Microbiology 3: 745-755.
- Chatterjee A, PA Balatti, W Gibbons and SG Pueppke (1990) Interaction of *Rhizobium fredii* USDA257 and nodulation mutants derived from it with the agronomically improved soybean cv McCall. Planta 180: 303-311.
- Davis EO and AWB Johnston (1990) Regulatory functions of the three *nodD* genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Molecular Microbiology 4: 933-941.
- Davis EO, IJ Evans and A WB Johnston (1988) Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. Molecular General Genetics 212: 531-535.
- De Jong AJ, R Heldstra, HP Spaink, MV Hartog, EA Meijer, T Hendriks, F Lo Schiavo, M Terzi, T Bisseling, A Van Kammen and SC De Vries (1993) *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. The Plant Cell 5: 615-620.
- de Maagd RA, AS Rao, IHM Mulders, L Goosen-

- de Roo, MCM van Loosdrecht, CA Wijffelman and BJJ Lugtenberg (1989) Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *Journal of Bacteriology* 171: 1143-1150.
- Debellé F and SB Sharma (1986) Nucleotide sequence of *R. meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucleic Acids Research*. 14: 7453-7472.
- Debellé F, F Maillat, J Vasse, C Rosenberg, F de Billy, et al., (1988) Interference between *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii* nodulation genes: genetic basis of the *R. meliloti* dominance. *Journal of Bacteriology* 170: 5718-5727.
- Debellé F, C Rosenberg, J Vasse, F Maillat, E Martínez, J Dénarié and G Truchet (1986) Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 168: 1075-1086.
- Demont N, M Ardourel, F Maillat, D Promé, M Ferro, JC Promé and J Dénarié (1994) The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *SyrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors *N*-acylated by (W-1)-hydroxylated fatty acids. *EMBO Journal* 13: 2139-2149.
- Dénarié J and J Cullimore (1993) Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74: 951-954.
- Dénarié J and P Roche (1992) *Rhizobium* nodulation signals In: *Molecular Signals in Plant Microbe Communications*, D.P.S. Verma (ed). CRC Press Boca Raton pp 295-324.
- Dénarié J, F Debellé and C Rosenberg (1992) Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Review of Microbiology* 46: 497-531.
- Djordjevic MA and JJ Weinman (1991) Factors determining host recognition in the clover-*Rhizobium* symbiosis. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 543-557.
- Djordjevic MA, R W Innes, CA Wijffelman, PR Schofield and BG Rolfe (1986) Nodulation of specific legumes is controlled by several distinct loci in *Rhizobium trifolii*. *Plant Molecular Biology*. 6: 389-401.
- Djordjevic MA, JW Redmond, M Batley and BG Rolfe (1987) Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *Rhizobium trifolii*. *EMBO Journal* 6: 1173-1179.
- Djordjevic MA, PR Schofield and BG Rolfe (1985) Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host specific nodulation genes result in mutants with altered host range ability. *Molecular General Genetics* 200: 463-471.
- Dowdle SF and BB Bohlool (1985) Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 1171-1176.
- Economou A, WDO Hamilton, AWB Johnston and JA Downie (1990) The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a Ca²⁺-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO Journal* 9: 349-354.
- Faucher C, S Camut, J Dénarié and G Truchet (1989) The *nodH* and *nodQ* host range genes of *R. meliloti* behave as avirulence genes in *R. leguminosarum* bv *viciae* and determines changes in the production of plant-specific extracellular signals. *Molecular Plant Microbe Interactions* 2: 291-300.
- Faucher C, F Maillat, J Vasse, C Rosenberg, AA N van Brussel, G Truchet and J Dénarié (1988) *Rhizobium meliloti* host range *nodH* gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. *Journal of Bacteriology* 170: 5489-5499.
- Firmin JL, KE Wilson, RW Carlson, AE Davis and JA Downie (1993) Resistance to nodulation of cv Afghanistan pea is overcome by *nodX*, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Molecular Microbiology* 10: 351-360.
- Firmin JL, KE Wilson, L Rossen and AWB Johnston (1986) Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* 324: 90-92.
- Fisher RF and SR Long (1993) Interactions of NodD at the *nod* box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *Journal of Molecular Biology* 233: 336-348.
- Fisher RF, TT Egelhoff, JT Mulligan and SR Long (1988) Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Development* 2: 282-293.
- Fred EB, FL Baldwin and E McCoy (1932) Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Studies in Science, Madison.
- Geelen D, P Mergaert, RA Geremia, S Goormachtig, M Van Montagu and M Holsters (1993) Identification of *nodSUIJ* genes in nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans* evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in the nod factor modification. *Molecular Microbiology* 9: 145-154.
- Geremia RA, P Mergaert, D Geelen, M Van Montagu and M Holsters (1994) The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of*

- the National Academy of Science USA 91: 2669-2673.
- Goethals K, M Gao, K Tomekpe, M Van Montagu and M Holsters (1989)** Common *nodABC* genes at Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: nucleotide sequence and plant-inducible expression. *Molecular General Genetics* 219: 289-298.
- Goethals K, G Van Eede, M Van Montagu and M Holsters (1990)** Identification and characterization of a functional *nodD* gene in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Journal of Bacteriology* 172: 2658-2666.
- Goethals K, M Van Montagu and M Holsters (1992)** Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 89: 1646-1650.
- Göttfert M, S Hitz and H Hennecke (1990)** Identification of *nodS* and *nodU*, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum* *nodYABC* and *nodIJ* genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 308-316.
- Göttfert M, D Holzhäuser, D Bänl and H Hennecke (1992)** Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 257-265.
- Göttfert M, B Horvath, E Kondorosi, P Putnoky, F Rodriguez-Quiñones and A Kondorosi (1986)** At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation on alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Molecular Biology* 191: 411-420.
- Györgypal Z, N Iyer and A Kondorosi (1988)** Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Molecular General Genetics* 212: 85-92.
- Györgypal Z, BG Kiss and A Kondorosi (1991)** Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* NodD protein. *BioEssays* 13: 575-581.
- Hadley H H and T Hymowitz (1973)** Speciation and Cytogenetics. In: *Soybean: Improvement, Production and Uses*. B.F. Caldwell Ed. (American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp 97-116.
- Heron DS and SG Pueppke (1984)** Mode of infection, nodulation specificity, and indigenous plasmids of 11 fast-growing *Rhizobium japonicum* strains. *Journal of Bacteriology* 160: 1061-1066.
- Heron DS, T Érsek, HB Krishnan and SG Pueppke (1989)** Nodulation mutants of *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 4-10.
- Hong GF, JE Burn and AWB Johnston (1987)** Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene *nodD*. *Nucleic Acids Research* 15: 9677-9690.
- Honma MA and FM Ausubel (1987)** *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84: 8558-8562.
- Honma MA, M Asomaning and FM Ausubel (1990)** *Rhizobium meliloti nodD* genes mediate host-specificity activation of *nodABC*. *Journal of Bacteriology* 172: 901-911.
- Horvarth B, CWB Bachem, J Schell and A Kondorosi (1987)** Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal interacting with the *nodD* gene product. *EMBO JOURNAL* 6: 841-848.
- Innes RW, PL Kuempel, J Plazinski, H Canter-Cremers, BG Rolfe and MA Djordjevic (1985)** Plant factors induce expression of nodulation and host range genes in *Rhizobium trifolii*. *Molecular general Genetics* 201: 426-432.
- Jarvis BDW, CE Pankhurst and JJ Patel (1982)** *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32: 378-380.
- John M, H Röhrig, J Schmidt, U Wieneke and J Schell (1993)** *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligo saccharide deacetylase. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 90: 625-629.
- Jordan DC and ON Allen (1984)** Rhizobiaceae. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition. Buchanan R.E. and N.E. Gibbons (eds). Williams and Wilkins Co., Baltimorepp 242-55.
- Keyser HH, BB Bohlool, TS Hu and DF Weber (1982)** Fast growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science* 215: 1631-1632.
- Koes RE, F Quattrocchio and JNM Mol (1994)** The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16: 123-132.
- Kondorosi E, J Gyuris, J Schmidt, J John, E Duda, B Hoffman, J Schell and A Kondorosi (1989)** Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO Journal* 8: 1331-1340.
- Krishnan HB and SG Pueppke (1991)** Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 512-520.
- Krishnan HB, A Lewin, R Fellay, WJ Broughton and SG Pueppke (1992)** Differential expression of *nodS* accounts for the varied abilities of *Rhizobium fredii* USDA257 and *Rhizobium* sp. strain NGR234 to nodulate *Leucaena* spp. *Molecular Microbiology* 6: 3321-3330
- Lerouge P, P Roche, C Faucher, F Maillet, G Truchet, JC Promé and J Dénarié (1990)** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.

- Lewin A, E Cervantes, W Chee-Hoong and WJ Broughton** (1990) *nodSU*, two new genes of the broad-host range *Rhizobium* strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala*. *Molecular Microbiology* 9: 17-29.
- Lewis-Henderson WR and MA Djordjevic** (1991) *nodT*, a positively-acting cultivar specificity determinant controlling nodulation of *Trifolium subterraneum* by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Plant Molecular Biology* 16: 515-526.
- Lewis-Henderson WR and MA Djordjevic** (1991a) A cultivar-specificity interaction between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and subterranean clover is controlled by *nodM*, other cultivar specificity genes, and a single recessive host gene. *Journal of Bacteriology* 173: 2791-2799.
- Lie TA** (1971) Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. *Plant Soil* 31, 117-127.
- Long SR** (1989) *Rhizobium-legume* nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56: 203-214.
- Luka S, J Sanjuan, RW Carlson and G Stacey** (1993) *noIMNO* genes of *Bradyrhizobium japonicum* are co-transcribed with *nodYABCSUIJ*, and *noI* is involved in the synthesis of the lipooligosaccharide nodulation signals. *Journal of Biological Chemistry* 268: 27053-27059.
- Martinez E, D Romero and R Palacios** (1990) The *Rhizobium* genome. *Critical Reviews on Plant Science* 9: 59-93.
- McIver J, MA Djordjevic, JJ Weinman, GL Bender and BG Rolfe** (1989) Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* caused by point mutations in *NodD* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 97-106.
- Meinhardt L W, HB Krishnan, PA Balatti and SG Pueppke** (1993) Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular Microbiology* 9: 17-29.
- Mergaert P, M Van Montagu, JC Promé and M Holsters** (1993) Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 90: 1551-1555.
- Michiels J, Petra De Wilde and J Vanderleyden** (1993) Sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *symR* gene. *Nucleic Acids Research* 21: 3893.
- Mulligan JT and SR Long** (1985) Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 82: 6609-6613.
- Ogawa J, Brierley HL and SR Long** (1991) Analysis of *Rhizobium meliloti* mutant WL131: novel insertion sequence ISRm3 in *nodG* and altered *nodH* protein product. *Journal of Bacteriology* 173: 3060-3065.
- Peters NK, JW Frost and SR Long** (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233: 977-980.
- Phillips DA** (1992) Flavonoids: plant signals to soil microbes. In: Phenolic metabolism in plants. Stafford H.A. and R.K. Ibrahim Eds. Plenum Press, New York.
- Phillips DA, CM Joseph and CA Maxwell** (1992) Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 99: 1526-1531.
- Pollitt RM and PH Raven** (1978) *Advances in Legume Systematics*, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, England 220 pp.
- Poupot R, E Martinez-Romero and JC Promé** (1993) Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopenta saccharides containing and N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus. *Biochemistry* 32: 10430-10435.
- Price NPJ, B Relic, F Talmont, A Lewin, D Promé, SG Pueppke, F Mailliet, J Dénarié, JC Promé and WJ Broughton** (1992) Broad host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Molecular Microbiology* 6: 3575-3584.
- Pueppke SG and WJ Broughton** (1995) Symbiotic specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis: *Rhizobium* sp. NGR234 and *R. fredii* USDA257 have exceptionally broad, interrelated host ranges. *Plant Soil* (En Prensa)).
- Redmond JW, M Battery, MA Djordjevic, RW Innes, PL Kuempel and BG Rolfe** (1986) Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323: 632-635.
- Relic B, X Perret, MT Estrada-García, J Kopcinska, W Golinowski, HB Krishnan, SG Pueppke and WJ Broughton** (1994) Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Molecular Microbiology* 13: 171-178.
- Roche P, F Debellé, F Mailliet, P Lerouge, C Faucher, G Truchet, J Dénarié and JC Promé** (1991) Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. *Cell* 67: 1131-1143.
- Rodríguez-Quiñones F, Z Banfalvi, P Murphy and A Kondorosí** (1987) Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant Molecular Biology* 8: 61-75.
- Rodríguez-Quiñones F, M Fernández-Burriel, Z Banfalvi, M Megías and A Kondorosí** (1989) Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences the efficiency of nodulation in strain RS1051 of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 75-83.

- Röhrig H, J Schmidt, U Welneke, E Kondorosí, I Barlier, J Schell and M John (1994) Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in N-acylation of the chitooligosaccharide backbone. Proceedings of the National Academy of Science USA 91: 3122-3126.
- Rossen L, AWB Johnston and JA Downie (1984) DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes *nodAB* and *C* required for root hair curling. Nucleic Acids Research 12: 9497-9508.
- Rossen L, CA Shearman, WA Johnston and JA Downie (1985) The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudates induces the *nodABC* genes. EMBO Journal 4: 3369-3373.
- Rostas K, E Kondorosí, B Horvath, A Simoncsits and A Kondorosí (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. Proceedings of the National Academy of Science USA 83: 1757-1761.
- Sadowsky MJ, PB Cregan, M Göttfert, A Sharma, D Gerhold, F Rodríguez-Quiñones, HH Keyser, H Hennecke and G Stacey (1991) The *Bradyrhizobium nolA* gene: its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. Proceedings of the National Academy of Science USA 88: 637-641.
- Sadowsky MJ, HH Keyser and BB Bohloul (1983) Biochemical characterization of fast and slow growing rhizobia that nodulate soybeans. International Journal of Systematic Bacteriology 33: 716-722.
- Sanjuan J, RW Carlson, HP Spaink, U Ramadas Bhat, M Barbour, J Glushka and G Stacey (1992) A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. Proceedings of the National Academy of Science USA 89, 8789-8793.
- Schell MA (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annual Review of Microbiology 47: 597-626.
- Scheu AK, A Economou, GF Hong, S Ghelani, AWB Johnston and JA Downie (1992) Secretion of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation protein NodO by haemolysin-type systems. Molecular Microbiology 6: 231-238.
- Schlaman HR M, RJH Okker and BJJ Lugtenberg (1992) Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. Journal of Bacteriology 174: 5177-5182.
- Schmidt J, H Rohrig, M John, V Wieneke, G Stacey, C Koncz and J Schell (1993) Alteration of plant growth and development by *Rhizobium nodA* and *nodB* genes involved in the synthesis of oligosaccharide signal molecules. The Plant Journal 4: 651-658.
- Schofield PR and JM Watson (1986) DNA sequence of *Rhizobium trifolii* nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding *nodABC* and *nodFE*. Nucleic Acids Research 14: 2891-2903.
- Scholla MH and GH Elkan (1984) *Rhizobium fredii* sp. nov, a fast-growing species that effectively nodulates soybean. International Journal of Systematic Bacteriology 34: 484-486.
- Scholla MH, JA Morefield and GH Elkan (1984) Deoxyribonucleic acid homology between fast-growing soybean nodulating bacteria and other rhizobia. International Journal of Systematic Bacteriology 34: 283-286.
- Schultze M, B Quiclet-Sire, E Kondorosí, H Virelizier, JN Glushka, G Endre, SD Géro and A Kondorosí (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. Proceedings of the National Academy of Science USA 89: 192-196.
- Schwedock J and SR Long (1989) Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *Rhizobium meliloti*, *nodP* and *nodQ*. Molecular Plant-Microbe Interactions 2: 181-194.
- Schwedock J and SR Long (1990) ATP sulphurylase activity of the NodP and NodQ gene products of *Rhizobium meliloti*. Nature 348: 644-647.
- Shearman CA, L Rossen, AWB Johnston and JA Downie (1986) The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene *nodF* encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by *nodD* plus a factor in pea root exudate. EMBO Journal 5, 647-652.
- Solheim B and J Raa (1973) Characterization of the substances causing the deformation of root hairs of *Trifolium repens* when inoculated with *Rhizobium trifolii*. Journal of General Microbiology 77: 241-
- Sousa C, JL Folch, P Boloix, M Megías, N Navba and C Quinto (1993) A *Rhizobium tropici* DNA region carrying the amino-terminal half of a *nodD* gene and a *nod*-box-like sequence confers host-range extension. Molecular Microbiology 9: 1157-1168.
- Spaink HP, DM Sheeley, AAN van Brussel, J Glushka, WS York, T Tak, O Geiger, EP Kennedy, VN Reinhold and BJJ Lugtenberg (1991) A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. Nature 354: 125-130.
- Spaink HP, J Weinman, MA Djordjevic, CA Wijffelman, JH Okker and BJJ Lugtenberg (1989) Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity-determining NodE protein. EMBO Journal 8: 2811-2818.
- Spaink HP, CA Wijffelman, RJK Okker and BJJ

- Lugtenberg (1989) Localization of functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nodD* genes. *Plant Molecular Biology* 12: 59-73.
- Spaalk HP, CA Wijffelman, E Pees, RJH Okker and BJJ Lugtenberg (1987) *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328, 337-340.
- Spaalk HP, AHM Wijffjes, KMG van der Drift, J Haverkamp, JE Thomas-Oates and BJJ Lugtenberg (1994) Structural identification of metabolites produced by the NodB and NodC proteins of *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology* 13: 821-831.
- Stacey G, S Luka, J Sanjuan, Z Banfalvi, AJ Nieuwkoop, JY Chun, LS Fosberg and R Carlson (1994) *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 176: 620-633.
- Stokkermans TJW and NK Peters (1994) *Bradyrhizobium elkanii* lipo-oligosaccharide signals induce complete nodule structures on Glycine soja Siebold et Zucc. *Planta* 193: 413-420.
- Stowers MD and RJ Eaglesham (1984) Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Plant Soil* 77: 3-14.
- Surin BP and JA Downie (1989) *Rhizobium leguminosarum* genes required for expression and transfer of host specific nodulation. *Plant Molecular Biology* 12: 19-29.
- Sutton MJ, EJA Lea, S Crank, R Rivilla, A Economou, S Ghelani, AWB Johnston and JA Downie (1993) NodO: A nodulation protein that forms pores in membranes. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* (Nester E.W. and D.P.S. Verma Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp 163-167.
- Swanson JA, JT Mulligan and SR Long (1993) Regulation of *syrm* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics* 134: 435-444.
- Trinick MJ (1980) Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* sp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *Journal of Applied Bacteriology* 49: 39-53.
- Trinick MJ and J Galbraith (1980) The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relationship to the cross inoculation concepts of legumes. *New Phytologist* 86: 17-26.
- Truchet G, DG Barker, S Camut, F De Billy, J Vasse and T Huguet (1989) Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Molecular general Genetics* 219: 65-68.
- van Brussel AAN, K Recourt, E Pees, HP Spaalk, T Tak., et al. (1990) A biovar specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Journal of Bacteriology* 172: 5394-5401.
- van Brussel AAN, SAJ Zaat, HCJ Canter-Cremers, CA Wijffelman, E Pees, et al. (1986) Role of plant root exudate and sym-plasmid localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of TSR factor, which causes thick and short roots on common vetch. *Journal of Bacteriology* 165: 517-522.
- van Rhijn P, J Desair, K Viassak and J Vanderleyden (1994a) Functional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 666-677.
- van Rhijn P, J Desair, K Viassak and J Vanderleyden (1994b) The NodD proteins of *Rhizobium* sp. strain BR816 differ in their interactions with coinducers and in their activities for nodulation of different host plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 3615-3623.
- van Rhijn PJS, B Feys, C Verreth and J Vanderleyden (1993) Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *Journal of Bacteriology* 175: 438-447.
- Vazquez M, A Davalos, A de las Peñas, F Sanchez and C Quinto (1991) Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *Journal of Bacteriology* 173: 1250-1258.
- Wang S and G Stacey (1991) Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter: a repeated structure for the *nod* box. *Journal of Bacteriology* 173: 3356-3365.
- Wedlock DN and BDW Jarvis (1986) DNA homologies between *Rhizobium fredii*, rhizobia that nodulate *Galega* sp. and other *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 550-558.
- Young JPW and AWB Johnston (1989) The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 341-349.
- Zaat SA, AAN Van Brussel, T Tak, E Pees and BJJ Lugtenberg (1987) Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *Journal of Bacteriology* 169: 3388-3391.
- Zaat SAJ, CA Wijffelman, IHM Mulders, AAN van Brussel and BJJ Lugtenberg (1988) Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. *Plant Physiology* 86: 1298-1303.