

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

Memoria realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla que presenta la Licenciada MACARENA TERNERO CARO para optar al grado de Doctor.

Macarena T.

El Director

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

M. Megías Guijo

Fdo. Dr. Manuel Megías Guijo.

Estudio de la región ily
que afecta a la simbiosis
Rhizobium tropici/Phaseolus vulgaris

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS USADOS EN ESTA TESIS.

A	adenina
Ap	ampicilina
BSA	albúmina bovina
bv.	biovariedad
C	citosa
<i>Cchv</i>	genes involucrados en la síntesis y exportación de β -glucanos cíclicos en <i>Agrobacterium</i> .
Cm	cloramfenicol
col.	colaboradores
c.s.p.	cantidad suficiente para
D.O.	densidad óptica
EDTA	ácido etiléndiaminotetraacético
EPS	polisacárido extracelular
Fix ⁺	fenotipo fijador de nitrógeno
Fix ⁻	fenotipo no fijador de nitrógeno
<i>fix</i>	genes de la fijación de nitrógeno no homólogos a los de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
G	guanina
Gm	gentamicina
INI	liberación de flavonoides por respuesta a la activación por la molécula señal
Km	kanamicina
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
log	logarítmica
LPS	lipopolisacárido
<i>lps</i>	genes implicados en la síntesis del lipopolisacárido
Mdal	megadaltons
ml	mililitros

N	Normalidad
NI	ácido nalidíxico
<i>ndv</i>	genes involucrados en la síntesis y exportación de β -glucanos en <i>Rhizobium</i>
Nif	proteínas codificadas por los genes <i>nif</i>
<i>nif</i>	genes de la fijación de nitrógeno
nm	nanómetro
Nod	proteínas codificadas por los genes <i>nod</i>
Nod ⁺	fenotipo nodulante
Nod ⁻	fenotipo no nodulante
<i>nod</i>	genes de la nodulación
pb	pares de bases
pSym	plásmido simbiótico
PVP	polivinil pirrolidona
Rf	rifampicina
rpm	revoluciones por minuto
scm	sitio de clonaje múltiple
SDS	sodium dodecil sulfato
sp.	especie
Sp	espectinomicina
St	estreptomina
T	timina
Tc	tetraciclina
³² P-dCTP	dexocitosina 5' (α - ³² P) trifosfato
%p/v	gramos de soluta por cada 100 ml de solución
μ Ci	microcuries
μ l	microlitros
μ g	microgramos
λ	ADN del fago lambda digerido con <i>HindIII</i>
λ^*	ADN del fago lambda digerido con <i>PstI</i>

TERMINOLOGIA INGLESA USADA EN ESTA TESIS.

"cluster"	grupo
"helper"	plásmido cooperador
"dark"	sin brillo
"dim"	reducida fluorescencia
"polylinker"	sitio de clonaje múltiple

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1. Generalidades	2
2. Organismos fijadores de nitrógeno	3
3. Fijación de nitrógeno en la Familia Rhizobiaceae	4
4. Lectinas	9
5. Tipos de nódulos	9
6. Nodulinas	10
6.1. Nodulinas tempranas	10
6.2. Nodulinas tardías	10
7. Genes <i>nod</i> y biosíntesis de la molécula señal	13
7.1. Genes <i>nod</i> estructurales: genes <i>nod</i> comunes y <i>nod</i> específicos	13
7.2. Regulación de los genes <i>nod</i> : el gen <i>nodD</i>	15
7.4. Papel de los genes <i>nod</i> en la molécula señal	20
7.4.1. <i>nodA</i> , <i>nodB</i> y <i>nodC</i>	20
7.4.2. <i>nodM</i>	20
7.4.3. <i>nodE</i> , <i>nodF</i> y <i>nodG</i>	21
7.4.4. <i>nodL</i>	22
7.4.5. <i>nodH</i> , <i>nodP</i> y <i>nodQ</i>	22
7.4.6. <i>nodS</i>	22
7.4.7. <i>nodI</i> y <i>nodJ</i>	23
7.4.8. <i>nodO</i>	23
7.5. Actividad biológica de la molécula señal	23
7.6. Expresión de los genes <i>nod</i> en bacteroides	27
8. β -glucanos	27
8.1. Estructura	27
8.2. Genes implicados en la síntesis de los glucanos cíclicos	28
8.3. Fenotipo de mutantes y posibles funciones	29
9. Lipopolisacáridos de <i>Rhizobium</i>	30
9.1. Estructura	30
9.2. Genética	34
9.3. Fenotipo simbiótico de mutantes de lipopolisacáridos	36
9.4. Posibles funciones simbióticas	38
9.5. Cambios en la estructura del LPS durante la simbiosis	39
10. Polisacáridos estructurales de los rizobios	40
10.1. Estructura y genética	41
10.2. EPSII	45

10.3. Fenotipo de los mutantes al EPS	46
10.4. Funciones biológicas de los exopolisacáridos	48
10.5. Estudio de los polisacáridos en bacteroides	50
10.6. Regulación de los genes de exopolisacárido	50
11. Polisacárido rico en Kdo	53
12. Estudio de las mutaciones auxotróficas que influyen en las características simbióticas	56
12.1. Relación entre requerimientos nutricionales y propiedades simbióticas	57
12.2. Recuperación de las propiedades simbióticas alteradas por la auxotrofia	57
12.3. Características de los nódulos inefectivos	58
13. <i>R. tropici</i> CIAT899	59
13.1. Genes de nodulación y molécula señal	61
13.2. Polisacárido extracelular de <i>R. tropici</i> CIAT899	64
13.3. β -glucanos cíclicos en <i>R. tropici</i> CIAT899	64
13.4. Lipopolisacáridos en <i>R. tropici</i> CIAT899	67
13.5. Otros estudios realizados en <i>R. tropici</i> CIAT899	67
II. OBJETIVOS	70
III. MATERIALES Y METODOS	71
1. Bacterias y plásmidos	72
2. Medios y condiciones de cultivo	72
3. Antimicrobianos y productos químicos añadidos a los medios de cultivo	72
4. Enzimas, isótopos y kits	78
5. Soluciones nutritivas para plantas	78
6. Análisis de perfil de plásmidos	80
7. Electroforesis en geles de agarosa	80
8. Electroforesis en geles de poliacrilamida: geles de secuenciación	81
9. Recuperación de ADN a partir de geles de agarosa	81
10. Extracción y purificación de ADN.	81
10.1. ADN total	81
10.2. ADN plasmídico	82
10.2.1. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i>	82
10.2.2. Aislamiento de plásmidos de <i>Rhizobium</i> de bajo peso molecular	82
10.3. ADN monocatenario	83
11. Marcaje radioactivo de las sondas de ADN	83

12. Hibridaciones de ADN	83
12.1. Preparación de las membranas	83
12.2. Prehibridación	84
12.3. Hibridación	84
12.4. Lavado de las membranas	84
12.5. Exposición de las membranas	84
13. Técnica de transferencia de ADN	85
13.1. Conjugación	85
13.1.1. Conjugación en filtro	85
13.1.2. Conjugación en placa	85
13.2. Transformación	85
14. Secuenciación	86
14.1. Estrategia de la secuenciación	86
14.2. Método de la secuenciación	86
15. Ensayos de nodulación	87
16. Ensayos de efectividad	88
17. Reaislamiento de bacterias a partir de nódulos	88
18. Estudio de microscopía	89
18.1. Microscopía estereoscópica	89
18.2. Microscopía semifina	89
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	90
1. Localización de cósmidos en el banco de genes de <i>R. tropici</i> CIAT899 que complementan mutaciones <i>exo</i> y <i>ndv</i> de <i>R. meliloti</i>	91
1.1. Complementación con el banco de genes de <i>R. tropici</i> CIAT899 de mutantes <i>ndvA</i> y <i>ndvB</i> de <i>R. meliloti</i>	91
1.1.1. Aislamiento de cósmidos que complementan a mutantes <i>ndvA</i> y <i>ndvB</i> de <i>R. meliloti</i> mediante selección en planta	91
1.1.2. Análisis de restricción de los cósmidos aislados	93
1.1.3. Caracterización del fenotipo de los cósmidos aislados	93
1.1.4. Localización de los genes <i>ndv</i> mediante hibridación en <i>R. tropici</i> CIAT899	98
1.2. Complementación con el banco de genes de <i>R. tropici</i> CIAT899 de cósmidos que complementan a mutantes <i>exo</i> de <i>R. meliloti</i>	100

1.2.1. Aislamiento de cósmidos que complementan a mutantes <i>exo</i> mediante selección en medio con calcofluor	100
1.2.2. Ensayo en plantas de alfalfa de los cósmidos aislados en el punto 1.2.1.	100
1.2.3. Análisis de restricción de los cósmidos aislados por brillo, y que recuperan el fenotipo simbiótico	101
2. Mutagénesis al azar de <i>R.tropici</i> CIAT899, con Tn5:: <i>mob</i>	101
2.1. Procedimiento de mutagénesis y aislamiento de mutantes de <i>R. tropici</i> CIAT899	101
2.2. Estudio de complementación de los mutantes obtenidos	106
2.2.1. Complementación de cósmidos portadores de regiones <i>exo</i> y <i>ndv</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899, aislados en 2.1.	106
2.2.2. Estudio de la complementación de los mutantes obtenidos con cósmidos de genes <i>exo</i> de <i>R. meliloti</i>	106
2.2.3. Complementación con genes de la nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899	108
2.3. Aislamiento por complementación, de cósmidos del banco de genes de CIAT899 que restauran la capacidad simbiótica de los mutantes RSP1MJ, RSP9MJ, RSP10MJ, RSP21MJ, RSP25MJ, RSP30MJ y RSP44MJ	109
2.4. Aislamiento por complementación de cósmidos del banco de CIAT899 que restauran el fenotipo calcofluor ⁺ en RSP35MJ y RSP36MJ	113
2.5. Aislamiento por restricción de los cósmidos aislados en 2.3 y 2.4.	113
2.5.1. Digestiones y clasificación de los cósmidos aislados en 2.3 y 2.4.	113
2.5.2. Hibridaciones de cósmidos entre sí	115
2.5.3. Mapa de restricción de los cósmidos pMT1, pMT9, pMT21 y pMT25	117
2.6. Complementación cruzada de los cósmidos aislados por recuperación del fenotipo simbiótico	117
2.7. Estudio de los fragmentos subclonados de los cósmidos pMT1 y pMT9	123
2.7.1. Subclonación de los cósmidos pMT1 y pMT9	123
2.7.2. Ensayo en plantas de las construcciones realizadas	123

2.7.3. Estudio por hibridación de la presencia del fragmento <i>Bam</i> HI clonado en el cósmido pMT904 en las mutantes RSP1, 9 y 21MJ	126
2.7.4. Secuenciación del fragmento <i>Bam</i> HI de pMT904	129
2.7.4.1. Estrategia de la secuenciación	129
2.7.4.2. Determinación de la secuencia	132
3. Análisis genético de los mutantes	135
3.1. Clasificación de las mutaciones por hibridación frente a Tn5:: <i>mob</i>	135
3.2. Localización de las mutaciones en el genoma de <i>R. tropici</i>	139
3.3. Análisis de la mutación RSP25MJ	142
3.4. Análisis de la mutación RSP36MJ	142
3.4.1. Clonación de la mutación RSP36MJ	142
3.4.2. Análisis por restricción de los fragmentos <i>Eco</i> RI clonados	144
3.4.3. Número de copias del gen mutado	144
3.4.4. Hibridación frente a cósmidos de su grupo	144
3.5. Análisis de la mutación RSP9MJ	144
3.5.1. Clonación de la mutación RSP9MJ	144
3.5.2. Mapeo del fragmento mutado	148
3.5.3. Número de copias del gen mutado	148
3.5.4. Análisis por hibridación del fragmento aislado frente a cósmidos de su grupo	148
3.5.5. Secuenciación de la mutación que afecta a RSP9MJ	152
3.5.6. Localización de genes de la ruta biosintética de isoleucina, valina, leucina y ácido pantoténico, en el genoma de <i>R. tropici</i> CIAT899	152
4. Características fisiológicas y simbióticas de RSP9MJ	163
4.1. Características fisiológicas	163
4.1.1 Crecimiento en medio mínimo y auxotrofia	167
4.2. Características simbióticas	167
IV. BIBLIOGRAFIA	168

I. INTRODUCCION

1. GENERALIDADES

Desde que en el año 1888 Hellriegel y Wilfarth dieron la primera explicación sobre la fijación biológica de nitrógeno, este proceso adquirió gran importancia, tanto por sus aplicaciones prácticas como por las perspectivas que presentaba a la investigación.

Los seres vivos requieren de una fuente nitrogenada para crecer, ya que el nitrógeno forma parte de moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos, y aunque este elemento químico represente el 80% de los gases que forman la atmósfera terrestre, tal como se encuentra, es un gas inerte, excepto para los relativamente pocos organismos que tienen la propiedad de transformarlo en una forma combinada.

Estos organismos que pueden utilizar el nitrógeno atmosférico en una forma biológicamente útil, pertenecen al grupo de los Procariotas, todos presentan en común el poseer el complejo enzimático de la nitrogenasa, proteína que cataliza la conversión del nitrógeno en amonio (Soberón, 1985). A este grupo de bacterias capaces de reducir o *fijar* nitrógeno atmosférico también se les conoce como microorganismos diazotrofos

En la industria química, nitrógeno e hidrógeno pueden combinarse y formar amonio (método de Haber y Bosch, 1914), que puede ser utilizado directamente como fertilizante, o bien ser procesado y producir otros compuestos tales como urea. Por este método industrial de obtención de amonio se necesitan aproximadamente 1,5 Kg de combustible fósil para producir 1 Kg de nitrógeno fertilizante (Nutman, 1976). Por el contrario, en el caso de la fijación biológica del nitrógeno, no existe pérdida de energía, dinero, y evita serios problemas de polución en el medio ambiente.

El ciclo del nitrógeno abarca todas las regiones de la biosfera, el hombre ha intervenido en él, mediante el cultivo a gran escala de las leguminosas fijadoras de nitrógeno atmosférico y por la fijación industrial.

Es difícil una determinación global de la cantidad de nitrógeno fijado anualmente, ya que existen grandes diferencias locales, pero se calcula que

alrededor de 130×10^9 Kg de nitrógeno podrían ser asimilados por procesos biológicos, comparado con menos de 50×10^3 Kg obtenidos por procesos industriales y atmosféricos (Delwiche, 1977).

2. ORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO.

La fijación de nitrógeno no ha sido encontrada en eucariotas, sino que ha quedado limitada a procariotas: arqueobacterias y eubacterias, entre las cuales se encuentra ampliamente extendida. Una distribución tan amplia, pero casual entre las bacterias, el descubrimiento de fijación de nitrógeno en las metanógenas, y por hibridación, la localización de genes *nif* entre las halófilas, ambas del grupo de las arqueobacterias, permite pensar que más que una especialización de determinados organismos, se trate de un atributo normal de las bacterias. Según Young (1992) serían las arqueobacterias el ancestro común de las que derivaron las eubacterias y más tarde los eucariotas, y esta propiedad podría haberse perdido en aquellos casos que fuese imposible de realizar o innecesaria.

La gran mayoría de los organismos fijadores de nitrógeno, quedan incluidos en la subdivisión α del grupo de las proteobacterias, un buen número de ellos han sido ya estudiados: agrupa desde organismos fijadores de vida libre, tanto fotótrofos (géneros *Rhodobacter* y *Rhodopseudomonas*), como metanoautótrofos (género *Methylocystis*); simbioses (género *Rhizobium*), simbioses-fotoautótrofos (género *Photorhizobium*); y otros.

La familia Rhizobiaceae está incluida en la subdivisión α y comprende cinco diferentes géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* y *Agrobacterium*.

Rhizobium y *Bradyrhizobium* forman nódulos fijadores en las raíces de plantas leguminosas, *Azorhizobium* induce nódulos en raíz y tallos de especies de *Sesbania*, mientras que especies de *Phyllobacterium* producen hipertrofias en hojas de distintas plantas.

Aunque *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* establecen un proceso simbiótico muy similar, parece ser que taxonómicamente *Rhizobium* se encuentra más

próximo a *Agrobacterium*, e igualmente *Bradyrhizobium* se asemeja más a *Rhodopseudomonas*.

En *Agrobacterium* al igual que en *Rhizobium*, la naturaleza de la interacción viene determinada por genes plasmídicos. En el género *Rhizobium* están en el plásmido simbiótico (pSym), en las especies de *A.tumefaciens* y *A. rubi*, es el plásmido Ti el responsable de la formación de tumores en la planta, mientras que en *A. rhizógenes*, el plásmido Ri es el que induce la proliferación de los pelos radiculares.

En *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, por el contrario, la información simbiótica tiene una localización cromosómica (Martínez y col., 1990).

En la Tabla 1 se muestra la actual clasificación de la familia Rhizobiaceae y para el caso de *Rhizobium*, los distintos grupos han sido agrupados según criterios de hibridaciones ADN-ADN, perfil de plásmidos, análisis de organización de ARN ribosomal y estudios de sus características fenotípicas, entre otros.

3. FIJACION DE NITROGENO EN LA FAMILIA RHIZOBIACEAE.

Rhizobium, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* van a inducir en plantas de la familia Leguminosae y de la no leguminosa Ulmaceae (*Parasponia*), la formación de estructuras especializadas o nódulos, en los que ocurre la fijación de nitrógeno.

Se establece una relación simbiótica altamente específica, ya que cada especie de rizobio tiene un rango de hospedador definido, sin embargo esta especificidad varía ampliamente entre los distintos rizobios, así *Rhizobium sp* NGR234 nodula hasta 35 géneros distintos de leguminosas y a la no leguminosa *Parasponia*, mientras que otros rizobios tienen un rango de hospedador mucho más estrecho, e incluso discriminan genotipos dentro de una misma especie de leguminosa (Lie, 1978).

El proceso de infección se inicia con la multiplicación de los rizobios en la rizosfera y en la superficie de las raíces de las leguminosas.

Tabla 1. Relación de especies que comprenden los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Ejemplos de rizobios con los grupos de inoculación cruzada).

Especies	Plantas hospedadoras
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
biovar <i>viciae</i>	<i>Vicia</i> (arveja), <i>Pisum</i> (guisante)* <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> (lenteja)
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trébol)
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> (judía, frijol)
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Melilotus</i> , <i>Medicago</i> (alfalfa), <i>Trigonella</i> *
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus</i> (judía, frijol), <i>Leucaena</i> (leucena), <i>Macroptilium</i> (siratro)
<i>Rhizobium etli</i> sp.	<i>Phaseolus</i> (judía, frijol).
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> , <i>Anthyllis</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega</i>
<i>Rhizobium kuakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i> (soja), <i>Vigna</i> (cowpea)
<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>	<i>Glycine max</i> (soja)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine</i> (soja), <i>Vigna</i> (cowpea)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Lupinus</i> (lupino), <i>Ornithopus</i>
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234, MPIK1030	Plantas tropicales y no leguminosas como la ulmácea <i>Parasponia andersonii</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>

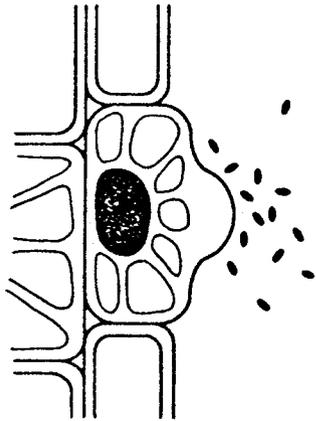
* Las estirpes de las mismas especies pueden nodular uno o varios de los hospedadores descritos.

Se conocen distintos mecanismos de entrada de la bacteria a la raíz de la planta: por espacios intracelulares de la epidermis (*Vigna*), por fisuras producidas en puntos donde emergen nuevas raíces (*Arachis*) (Sen y Weaver, 1984), por rupturas locales en la epidermis (*Parasponia*), (Marvel y col., 1985) o bien, la forma más común en leguminosas, a través de pelos radicales (alfalfa, guisante, etc.), en los que los rizobios inducen curvatura y formación de un foco de infección.

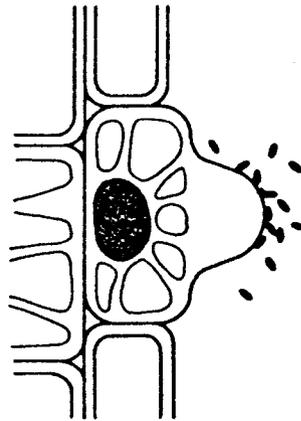
Las distintas vías de infección vienen determinadas por la planta hospedadora. Una leguminosa dada es siempre infectada por el mismo mecanismo, cualquiera que sea la cepa de rizobio que le infecte, por lo tanto, la bacteria usará un mecanismo u otro en función de la leguminosa que nodule. Igualmente, es la planta la que determina las características morfológicas y de desarrollo del nódulo (aunque la mayoría de los nódulos han sido encontrado en raíces, sin embargo, en algunas leguminosas acuáticas de los géneros *Aeschynomene* y *Sesbania*, aparecen también en sus tallos). Todo esto, junto con la existencia de plantas leguminosas que ocasionalmente presentan una nodulación espontánea en ausencia de *Rhizobium* (Truchet, y col., 1989) indica que es la planta hospedadora la que posee la información genética para la nodulación, y que es la bacteria la que desencadena su respuesta. También el número de nódulos es controlado por la planta, mediante una respuesta sistémica que suprime una posterior nodulación (Caetano-Anollés y col., 1990).

La parte de la raíz más susceptible de ser infectada es justo detrás del meristemo apical o zona de elongación, en la zona de emergencia de los pelos radicales (Bhuvanewari y col., 1981). Para estimular la movilidad de las bacterias hacia estas zonas de la raíz, la planta excreta sustancias (aminoácidos, azúcares y ácidos carboxílicos) hacia los que los rizobios muestran una quimiotaxis positiva, sin determinar por ello ninguna especificidad (Gaworzewska y Carlile, 1982). Aunque esta movilidad no sea un factor requerido para la nodulación, proporciona a la bacteria ventajas competitivas (Smit y col., 1989).

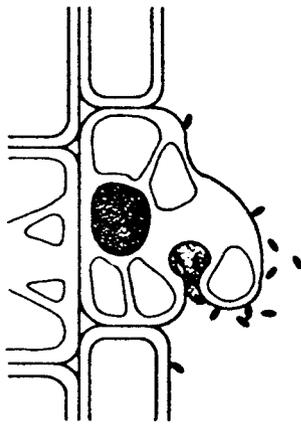
La unión de la bacteria a los pelos radicales es frecuentemente polar y sigue el modelo que se muestra en la Figura 1, en donde interviene en primer lugar, una proteína de la superficie de los rizobios llamada rhicadhesina, que es una proteína que une calcio y aparece común entre la



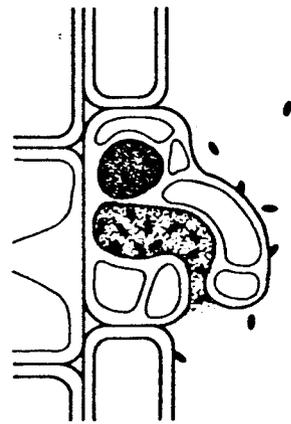
**INTERCAMBIO DE
SEÑALES**



ANCLAJE



CURVATURA



INICIO DEL HILO

Figura 1.
Primeras etapas del proceso de infección.

familia Rhizobiaceae, incluyendo el género *Agrobacterium*. Los receptores de la planta para esta proteína, aún no han sido identificados.

En un segundo paso, fibrillas de celulosa de los rizobios permiten que se aglutinen en la superficie de la raíz. Mutantes no productores de fibrillas presentan una nodulación normal, lo que indica que este paso no es esencial para la nodulación (Smit y col., 1987).

Durante la penetración de los rizobios en las células vegetales, parece que se induce y reorienta el crecimiento de la pared de la célula vegetal, posiblemente por una reestructuración del citoesqueleto. Estos cambios repercuten en la curvatura del pelo radical, donde la bacteria queda atrapada, y por invaginación inicia el cordón de infección (Bhuvaneshwari y col., 1980).

Paralelo al desarrollo del cordón de infección, los rizobios inducen la división y diferenciación de células internas del cortex (Dudley y col., 1987). Esta actividad mitótica inducida permite la formación de un primordio. El hilo de infección migra hacia las células del primordio que se están dividiendo, y una vez que lo han alcanzado libera en el citoplasma de la célula vegetal a los rizobios, por un proceso de endocitosis (Mellor y Werner, 1987). A partir de las células del primordio se van a originar los distintos tejidos del nódulo. En nódulos inducidos en guisante, alfalfa, trébol, del primordio distal se inicia una región meristemática.

Los rizobios liberados a la célula vegetal quedan englobados en la membrana peribacteroidal (PBM), formada a partir del aparato de Golgi y/o retículo endoplasmático de la planta. Ahora los rizobios sufren un proceso de transformación a bacteroide o formas activas fijadoras de nitrógeno.

Finalmente el nitrógeno fijado por los bacteroides difunde a través de la membrana peribacteroidal hacia el citoplasma de la célula vegetal, y es asimilado por la vía glutamino sintetasa como amidas o ureídos (Vance y col., 1988)

LECTINAS

Parece ser que las lectinas de la planta también participan en el proceso de simbiosis. Una posible función es que bajo ciertas condiciones de cultivo (deficiencias de manganeso), las lectinas ayudan a la acumulación y al anclaje de los rizobios a los pelos radicales (Kinje y col., 1988) , recientemente ha sido descrito un modelo en *B. japonicum* , en donde parece ser que la interacción es entre las lectinas y las fimbrias de la bacteria (Smith y Wollum, 1992).

Una segunda función relacionada con la especificidad de la interacción , fue comprobada por Díaz y col. (1989), donde lectinas de raíz de guisante fueron transferidas a trébol blanco, resultando una planta híbrida que no se veía afectada en su nodulación por *R.t rifolii*, pero que ahora podía ser infectado por *R. leguminosarum* bv. *viciae* aunque la mayoría de los nódulos inducidos por *R. leguminosarum* bv. *viciae* eran anormales, con bacterias en los espacios intracelulares del cortex, hilos de infección abortados y un meristemo nodular degenerado, una minoría evolucionaban normalmente y fijaban nitrógeno.

En esta respuesta específica aún no es conocida el factor que en *Rhizobium* pueda ser sustrato de las lectinas.

5. TIPOS DE NODULOS.

Dos tipos de nódulos de morfología visiblemente distinta forman las leguminosas: nódulos indeterminados y nódulos determinados.

Nódulos indeterminados lo forman leguminosas tales como: *Pisum*, *Vicia*, *Trifolium* y *Medicago*, mientras que las leguminosas tropicales como *Glycine*, *Phaseolus* y *Vigna* los forman determinados. Ambos tipos presentan tejidos similares formados a partir del primordio inducido por *Rhizobium*: el tejido central que contiene células infectadas y no infectadas, rodeado por el parénquima, endodermis y el tejido más externo o cortex. Los haces vasculares se localizan en el parénquima del nódulo (Newcomb y col , 1979).

Los nódulos indeterminados, de forma alargada y cilíndrica, se caracterizan por tener un meristemo apical persistente, a partir del cual, y de forma gradual, se van a formar las distintas zonas del nódulo, distinguiéndose en el mismo desde las zonas tempranas de la simbiosis hasta la senescencia del bacteroide. En estos nódulos el nitrógeno asimilado se transporta a la planta como asparragina (Pate y Atkins, 1983).

El nódulo determinado carece de meristemo apical y su forma cilíndrica resulta por alargamiento de las células infectadas y no por división. El nitrógeno es asimilado en forma de ureídos y es transportado a través de las células no infectadas hasta los haces vasculares, como alantoína o ácido alantoico (Newcomb y col., 1979).

6. NODULINAS

A aquellas proteínas de la planta que se expresan de forma específica en el núcleo, se les llama nodulinas. Nodulinas tempranas son aquellas que intervienen en el proceso de infección, formación del primordio y diferenciación del meristemo nodular (Nap y Bisseling, 1990). Las nodulinas tardías son expresadas en el nódulo maduro e intervienen en la fijación del nitrógeno y asimilación, transporte de oxígeno, metabolismo del carbono y otros procesos especializados que ocurren en la membrana peribacteroidal (Nap y Bisseling, 1990). Otras enzimas comunes a otros órganos de la planta, aparecen en el nódulo con una actividad incrementada

6.1. Nodulinas tempranas.

La expresión de nodulinas en la raíz de la planta leguminosa ocurre ya desde la interacción de los rizobios con los pelos radiculares. En guisante se expresan dos genes: RH-42 y RH-44, no detectados en plantas no inoculadas, que parecen intervenir en la curvatura y deformación del pelo radical (Sánchez y col., 1991).

PsENOD12 es una nodulina ampliamente estudiada en guisante. Se detecta desde las primeras etapas de infección, en células que forman parte del cordón de infección; ésta localización y que se trate de una proteína

rica en prolina, sugieren que sea un componente de la pared celular (Averyhardt-Fullard y col., 1988). Se localiza tanto en el lugar de infección como en las células del interior del cortex que se están dividiendo, pudiendo intervenir en la formación del primordio.

Esta nodulina también se ha detectado en fases posteriores del desarrollo del nódulo, está presente en las células de la zona de invasión adyacentes al meristemo apical.

ENOD5 es otra nodulina también expresada desde el inicio de la infección, es también una proteína rica en prolina que parece ser componente de la membrana plasmática. Es detectada en células que contienen el hilo de infección y posteriormente en células de la zona de invasión del nódulo, pudiendo formar parte de la membrana del hilo de infección así como de la membrana peribacteroidal.

ENOD3 y ENOD14 se expresan exclusivamente en las células infectadas de la zona de invasión del nódulo (Scheres y col., 1990). Tienen una estructura similar a la de proteínas que captan metales, por lo que podrían funcionar en el transporte de Fe o Mo a los bacteroides, necesarios para la síntesis de la enzima nitrogenasa (Scheres y col., 1990).

La actividad de ENOD3 y ENOD14, así como la de de ENOD5 y ENOD12, decrece en las zonas simbióticas más senescentes de los nódulos indeterminados..

La nodulina ENOD2 identificada en guisante, soja y alfalfa (Van de Wiel y col, 1990. Van de Wiel y Hirsch, comunicación personal); y GmENOD13 de soja (Van de Wiel y Hirsch, c.p.) aparecen expresadas en el parénquima nodular. Por su estructura parecen ser componentes de la pared celular y probablemente contribuyan a la morfología del parénquima del nódulo y a la formación de la barrera de difusión de oxígeno (Gloudemans y col., 1989).

6.2. Nodulinas tardías.

Entre las nodulinas tardías la leghemoglobina (Lb) es la más abundante, constituyendo el 20% de las proteínas solubles del nódulo, actúa como transportador de O₂ en las células infectadas, facilitando su

difusión hacia el bacteroide (Govers y col., 1986). Son codificadas por una familia de genes, y a nivel de proteínas se observan distintos productos, que son sintetizados a distintos tiempos durante el desarrollo del nódulo lo que pudiera estar relacionado con las distintas afinidades de O₂ que muestran (de Bruijn y col., 1990).

En nódulos de soja, la uricasa es la segunda nodulina más abundante (Bergman y col., 1983), y es producto de un gen distinto del que codifica para la uricasa de raíz y hoja. Es esencial en nódulos determinados, para la ruta biosintética de ureídos y se localiza en los peroxisomas de células no infectadas. Su expresión en nódulos de soja y frijol no parece dependiente del inicio de la fijación de nitrógeno (Larsen y Jochimsen, 1986), sino que son las bajas concentraciones de O₂ (4-5%) las que inducen su síntesis y su actividad.

Las enzimas glutamina y glutamato sintasas (GS y GOGAT), muestran altos niveles de actividad paralelos a la nitrogenasa, ambas enzimas son responsables de la asimilación del amonio que procede de la reducción del nitrógeno en el bacteroide (Atkins, 1987).

Se han caracterizado distintas formas de la enzima GS en nódulo, distinguiéndose dos tipos: aquellas de expresión nódulo-específicas, y otras cuya expresión se ve claramente aumentada durante la simbiosis (Forde y Cullimore, 1989). En ambos casos la expresión o aumento de la actividad de estas proteínas, ocurre justo antes que sea activa la nitrogenasa y sólo en células infectadas (Padilla y col., 1987).

Las formas nódulo-específicas de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y sucrosa sintasa, intervienen en el metabolismo del carbono, regulando su flujo, necesario para el mantenimiento del nódulo, respiración del bacteroide, síntesis de ATP y poder reductor para la actividad de la nitrogenasa, así como proporcionar el esqueleto carbonado para la asimilación y transporte del nitrógeno (Atkins, 1987).

En soja también se han caracterizado varias nodulinas (Ngm24, Ngm26 y Ngm23) asociadas a la membrana peribacteroidal (Fortin y col., 1985). Esta membrana actúa de interfase entre la célula vegetal infectada y el simbionte y es muy probable que estas enzimas regulen el intercambio de metabolitos.

Además de las anteriores nodulinas tardías, otras enzimas pueden detectarse en nódulo que difieren en sus propiedades físicas, cinéticas o inmunológicas de las formas presentes en raíz, y también a esas formas nódulo-específicas se les consideran nodulinas.

7. GENES *nod* Y BIOSÍNTESIS DE LA MOLECULA SEÑAL.

Entre la planta y la bacteria se da un intercambio de señales que va a determinar la especificidad del proceso simbiótico: a un primer nivel exudados de la raíz de la planta, tras una interacción específica con la proteína NodD, van a inducir la transcripción de los genes de nodulación.

En un segundo nivel, los genes *nod* estructurales (Figura 2 A) son los que intervienen en la síntesis de señales lipo-oligosacarídicas (Figura 2 B), que también de forma específica inducen cambios, en la raíz de la planta hospedadora, iniciando el proceso de infección.

7.1. Genes *nod* estructurales: *nod* comunes y *nod* específicos.

Los genes de la nodulación conocidos como genes *nod* y los más recientemente encontrados, como genes *nol* son aquellos que intervienen en los procesos de infección y nodulación. En todas las cepas de *Rhizobium* estudiadas, se han encontrado en el plásmido simbiótico, junto con otros genes implicados en la fijación de nitrógeno (*nif fix*) (Banfalvi y col., 1981. Scott y col., 1984) Por el contrario, en *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, tienen una localización cromosómica (Figura 2 A).

Los genes *nod*, se han clasificado como comunes y específicos. Se llaman comunes a los genes *nodABC-IJ*, por encontrarse en todas las cepas de rizobios estudiadas. Son genes que pueden ser funcionalmente intercambiables entre las distintas especies y biovariedades sin modificar el rango de hospedador (Fisher y col., 1985. Marvel y col., 1985).

Mutaciones en cualquiera de los restantes genes *nod* no pueden ser totalmente complementadas con genes de otras especies de rizobios (Kondorosi y col. 1984. Djordjevic y col., 1985. Debellé y col., 1986).

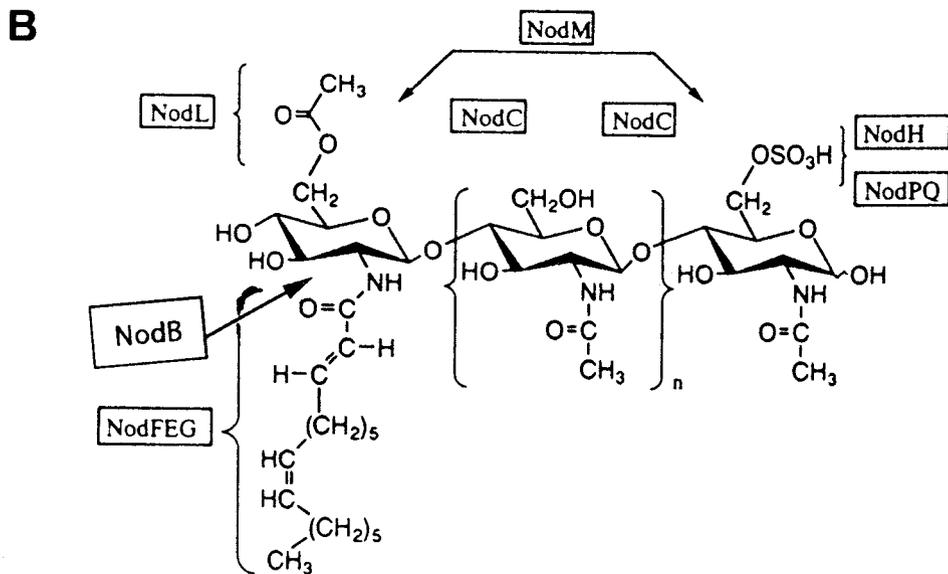
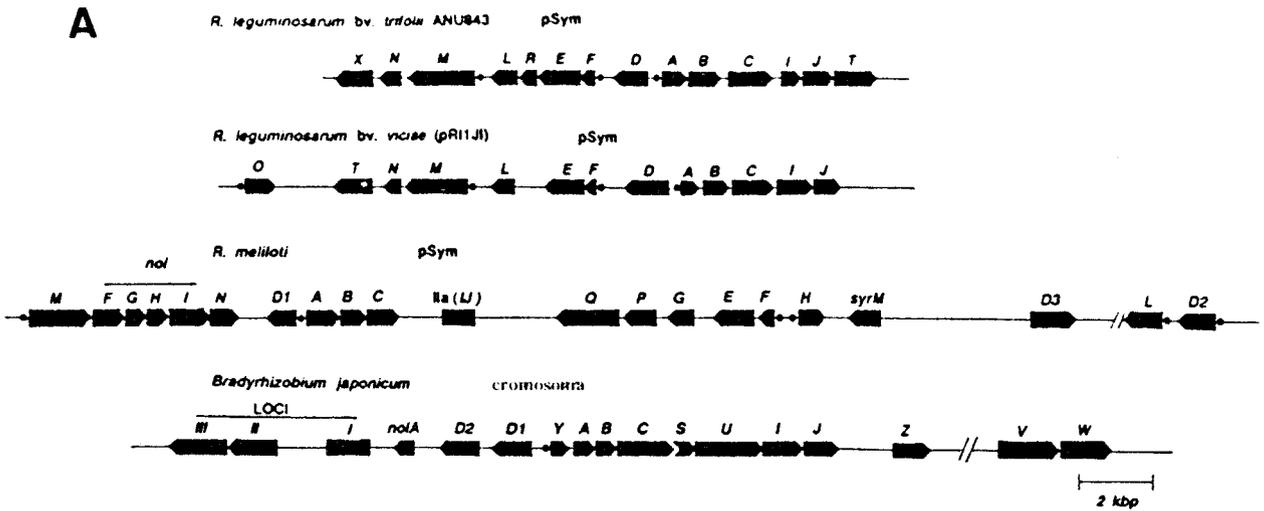


Figura 2.

A. Organización de los genes *nod* en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, bv. *viciae*, *R. meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*. Las flechas indican la dirección de transcripción de los genes, y los círculos negros las cajas *nod*.

B. Estructura del factor Nod de *R. meliloti*: n indica el número de residuos de glucosamina, y las flechas explican el posible papel de las proteínas Nod durante su síntesis (Higashi, 1993).

Horvath y col., 1986. Lewin y col., 1990). Aunque estas mutaciones no implican la pérdida total de la capacidad de nodulación, sí causan retraso y disminución en el número de nódulo o cambios de la especificidad a determinadas plantas hospedadoras. Son por ello, llamados genes *nod* específicos, que no han sido identificados en todas las cepas de rizobios

7.2. Regulación de los genes *nod* : el gen *nodD*.

Para la expresión de los genes *nod* estructurales, se requiere de la presencia de compuestos exudados por la raíz de la planta, generalmente flavonoides, y de la proteína reguladora NodD. Esta proteína se une a secuencias conservadas en la región promotora de los genes *nod*, llamadas cajas de nodulación (cajas *nod*) (Fisher y Long, 1989. Kondorosi y col., 1989). La presencia de secuencias invertidas repetidas en todas las cajas *nod*, favorece la hipótesis que NodD se una a las cajas *nod* como un multímero (Goethals y col., 1992).

El gen *nodD* se ha encontrado en todas las cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*; es requerido para la nodulación, ya que mutantes que no contienen un gen *nodD* funcional, no pueden nodular sus hospedadores (Honma y Ausubel, 1987. Kondorosi , 1992). Sin embargo, el número de copias del gen varía entre las distintas especies de rizobios: una sólo copia presentan *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii* (Kondorosi, 1992), dos copias *B. japonicum* (Göttfert y col., 1989), *R. fredii* (Ramakrishnan y col., 1986) y *Rhizobium* sp. NGR234 (Horvath y col., 1987). En el caso de *R. meliloti* existen tres copias del gen *nodD* (Barnett y Long, 1990) y un cuarto gen, *syrM*, cuya secuencia es homóloga a la de los genes *nodD*, que también interviene en la regulación de los genes *nod* (Rushing, 1991). En *R. tropici* CIAT899 se han encontrado hasta cinco copias del gen (van Rhijn y col., 1993. Sousa y col., 1993).

La proteína NodD por secuencia y comportamiento homólogo se ha clasificado dentro de una familia de proteínas activadoras de la transcripción en procariotas, llamadas LysR. Presentan en el extremo N-terminal, una región de unión al ADN en forma de hélice doblada (Henikoff y col., 1988). Esta región se encuentra muy conservada entre las distintas proteínas NodD, mientras que el extremo C-terminal presenta mayor variación. Así se pensó que fuese esta región carboxilo la que interviniese en el reconocimiento específico a los exudados de la planta

(Györgypal y col., 1991), sin embargo mutaciones que alteran la especificidad de la interacción con flavonoides, mapean en la región N-terminal, lo que parece indicar que es toda la estructura terciaria de la proteína la responsable de la especificidad (Milver y col., 1989. Spaink y col., 1989a).

La proteína NodD se localiza en la membrana citoplasmática (Recourt, y col., 1989) y se cree que sea el sitio de interacción con flavonoides, aunque se desconoce el mecanismo de activación. Una forma soluble de NodD se traslada hasta el citoplasma desde la membrana y se une a las cajas *nod* (Fisher y col., 1988. Schlaman y col., 1992) produciendo la activación de la transcripción de los genes de la nodulación.

Las distintas proteínas NodD muestran un reconocimiento específico hacia determinados flavonoides. En *R. meliloti*, NodD1 induce los genes *nod* en la presencia de luteolina (Peters y col., 1986), NodD2 interacciona también de forma específica con metoxichalcona y NodD3 aunque también puede interaccionar con inductores, en combinación con SyrM, no necesita moléculas inductoras para activar los genes *nod* (Maillet y col., 1990).

Se observa como las proteínas Nod de rizobios de estrecho rango de hospedador responden a pocos flavonoides, mientras que para amplio rango de hospedador, presentan mayor espectro de moléculas inductoras (Le Strange y col., 1990).

Entre los compuestos exudados por la planta, no todos presentan actividad inductora, se han encontrado que algunos son inhibidores de los genes *nod*. Estas moléculas inhibidoras son de estructura similar a los flavonoides inductores y se supone que actúan de forma competitiva, siendo igualmente especie específicos (Kosslak y col., 1990).

NodD parece que regula la expresión de los genes *nod*, también en función de la concentración de amonio. En *R. meliloti*, NodD3 reprime la transcripción de los genes *nod* en condiciones de exceso de amonio (Dusha y col., 1989) (Figura 3). El gen *syrM* interviene además en la regulación de la expresión de los genes *exo*, implicados en la síntesis del exopolisacárido ácido (Barnett y Long, 1990).

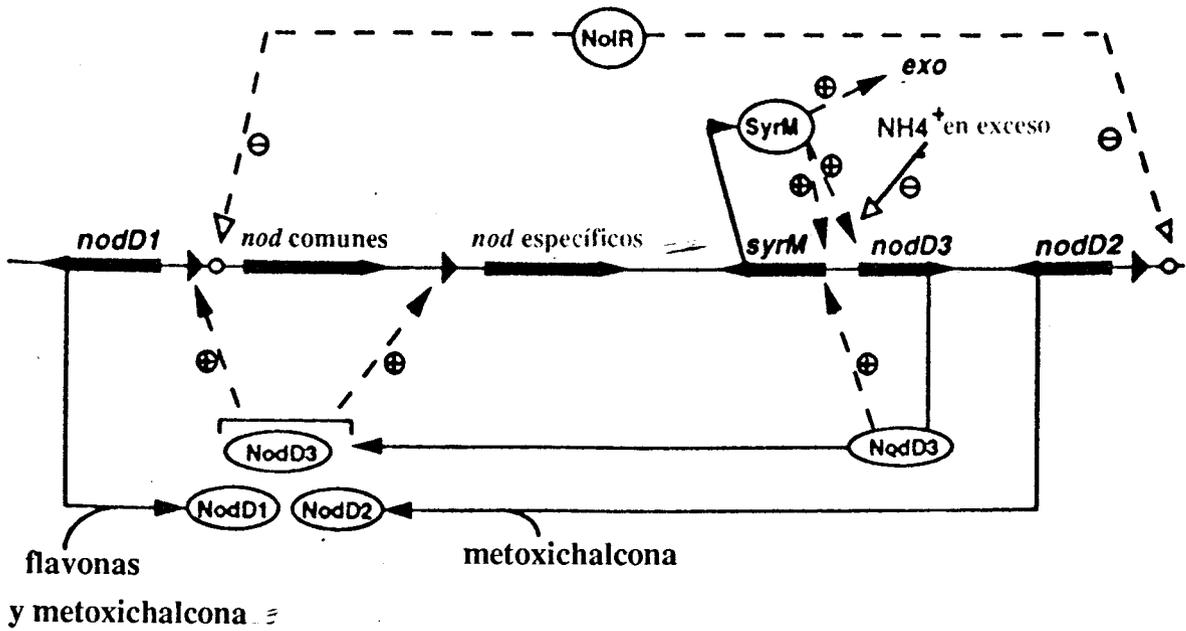


Figura 3.

Modelo de la regulación de los genes *nod* en *R. meliloti*. Los triángulos negros representan las cajas *nod* y los círculos abiertos, los sitios de unión de los represores (*exo*: genes de síntesis de exopolisacárido) (Denarié y col., 1993).

nolR es un gen represor encontrado en algunas cepas de *R. meliloti*, que controla negativamente la expresión de NodD1 y NodD2 uniéndose a sus regiones promotoras (Kondorosi, 1992). Mutantes en *nolR* presentan un ligero retraso en la nodulación lo que sugiere que NolR sea requerida para optimizar la expresión de los genes *nod* durante la infección y nodulación (Kondorosi y col., 1989).

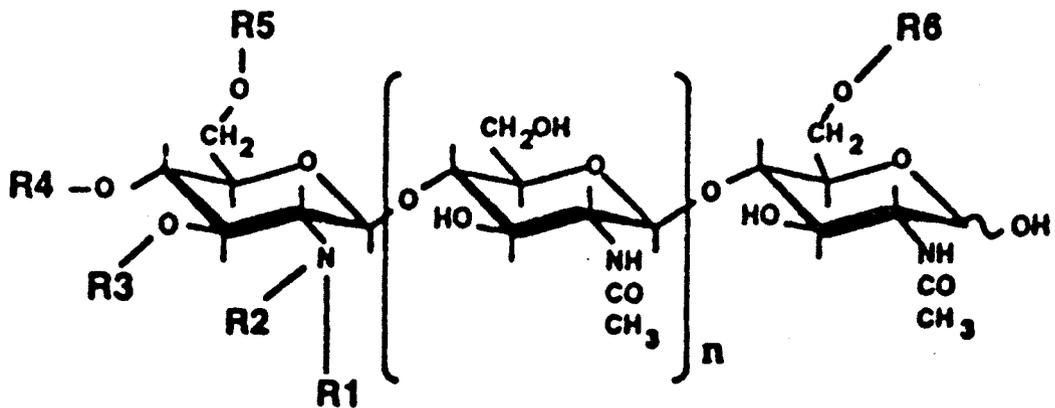
En *B. japonicum* se han encontrado otros genes *nod* reguladores que también determinan especificidad a hospedador: los genes *nodVW* codifican para un sistema regulatorio, donde NodV es un sensor de membrana y NodW un regulador (Göttfret y col., 1990); y el gen *nolA*, cuyo producto es análogo a unas proteínas reguladoras de la transcripción llamadas MerR (Sadowsky y col., 1991).

7.3. Estructura de los lipo-oligosacáridos.

A partir del descubrimiento inicial de los lipooligosacáridos producidos por *R. meliloti* 2011 (Lerouge y col., 1990), ya se han estudiado la estructura de estos compuestos en otras especies.

La estructura básica del lipooligosacárido, también llamado factor de nodulación o molécula señal, consta de un esqueleto oligosacarídico de N-acetil-D-glucosamina con enlaces β -1,4, y cuya longitud varía entre tres y cinco unidades de azúcar (Figura 4). El grupo amino del azúcar terminal no reducido va unido a un ácido graso de estructura variable. Otros sustituyentes sobre esta estructura básica dependen de la especie de rizobio (Spaink, 1992).

R. meliloti produce una familia de factores Nod, de tres, cuatro o cinco unidades de N-acetil- β -1,4-D-glucosamina, O-acetilados y N-acilados en al azúcar no reducido; sulfatados en el azúcar reducido (Figura 4) (Lerouge y col., 1990. Roche y col., 1991). El mayor sustituyente ácido graso es 16:1 C, insaturado en las posiciones 2 y 9 (Lerouge y col., 1990), también se encuentran ácidos grasos de 16:3 C (Schultze y col., 1992).



Especie	Sustituyentes						n
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	
Rm	16:2/16:3				Ac	S	2-3
Rlv	18:4/18:1				Ac		2-3
RNGR	18:1/16:0	Me	Carb	Carb		Me-Fuc (S or Ac)	3
Bj	18:1Δ9					Me-Fuc	3
Ac	18:1/18:0	Me			Carb	Ara	2-3

Figura 4.

Estructura del factor Nod producido por diferentes especies de rizobios. En la tabla, R indica los distintos sustituyentes. Bacterias: Rm, *R. meliloti*; Rlv, *R. leguminosarum* bv. *viciae*; RNGR; *R. sp.* NGR234; Bj, *B. japonicum* y Ac, *A. caulinodans*. Sustituyentes: Ac, acetil; Ara, arabinosil; Carb, carbamoil; Me-Fuc, metil-fucosil; Me, metil y S, sulfato (Denarié y Cullimore, 1993).

Los factores Nod de *R. leguminosarum* bv. *viciae* tienen la misma estructura general (Figura 4), pero que no se encuentran sulfatados, y donde el mayor sustituyente ácido graso es altamente insaturado (18:4 C) (Spaink y col., 1991).

Las estructuras lipooligosacáridicas de *R. leguminosarum* bv *trifolii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *R. fredii*, *Rhizobium* sp. NGR234 y *R. tropici* han sido recientemente descritas.

7.4. Papel de los genes *nod* en la molécula señal.

La comparación de las secuencias de los productos de los genes *nod* con otras proteínas de función conocida, así como el estudio de las estructuras producidas tras la mutación de genes *nod*, ha permitido llegar a las posibles funciones bioquímicas de las proteínas Nod:

7.4.1. *nodA*, *nodB* y *nodC*.

Mutaciones en estos genes bloquean la producción de la molécula señal en todas las especies probadas, presentando un fenotipo Nod⁻ (Lerouge y col., 1990. Spaink y col., 1991a).

NodA y NodB son proteínas citosólicas (Schmidt y col., 1986. Schmidt y col., 1988). Especies carentes de estas proteínas producen derivados no acilados. Recientemente NodB ha sido identificada como una deacetilasa de oligosacáridos de N-acetilglucosamina (John y col., 1993).

NodC es una proteína de membrana (John y col., 1988) que guarda homología con una quitina sintasa de levadura (Bulawa, 1991), lo que sugiere una función como N-acetilglucosaminil transferasa, en la síntesis del esqueleto aminocarbonado.

7.4.2. *nod M*.

Presenta una secuencia homóloga a una glucosamina sintasa de *E. coli* (*glmS*) (Marie y col., 1992), se cree que intervenga en la síntesis de

glucosamina, claro precursor del esqueleto oligosacárido de la molécula señal.

Mutaciones en este gen, resultan en una disminución de la cantidad del factor Nod producido, pero de idéntica estructura, y no afectando prácticamente a la nodulación (Spaink y col., 1991).

7.4.3. *nodE*, *nodF* y *nodG*.

La homología de la secuencia de NodF con proteínas transportadoras de grupos acilos (ACP) y de NodE con β -cetoacilsintasas (Bibb y col., 1989. Downie, 1991), sugiere que están implicadas en la síntesis de la cadena ácido graso. Apoya esta hipótesis que NodF contenga como grupo prostético 4'-fosfopantoteinato (Geiger y col., 1991), común en todas las ACP de procariotas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos.

La mutación del gen *nodE* o *nodF*, no polar respecto a *nodE*, en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, resulta en una molécula señal N-acilada por ácido vaccénico (18:1 C), a diferencia de la cepa silvestre (18:4 C). Las mismas mutaciones resultan en *R. meliloti*, en sustituciones de los ácidos grasos normales (16:2 C, 16:3 C), por ácido vaccénico (Demont y col., 1993).

Los genes *nodFE*, a pesar de tener unas secuencias altamente conservadas entre *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii* y *R. meliloti*, no son funcionalmente intercambiables, y además determinan la especificidad de hospedador de estas tres especies (Debellé y Sharma, 1986. Debellé y col., 1988. Spaink y col., 1989. Surin y Downie, 1989).

La proteína NodG encontrada en *R. meliloti*, presenta una secuencia homóloga a dehidrogenasas y β -cetoacilreductasas (Debellé y Sharma, 1986). Esta homología, y que forme parte del operón *nodEF*, parece indicar que también interviene en la síntesis de la cadena acilo, sin embargo mutaciones en este gen no afectan a la molécula señal (Demont y col., 1993).

Recientemente, en *R. meliloti* se han encontrado otros factores Nod, N-acilados por ácidos grasos ($\omega-1$)-hidroxilados de 18 a 26 carbonos, también encontrados como componentes del LPS, (de 26 C;) sin embargo,

los genes *nodFE* no intervienen en la síntesis de estos sustituyentes (Demont y col., 1993).

7.4.4. *nodL*.

La proteína NodL presenta homología con acetil transferasas (Downie, 1989) y es esencial para la acetilación del factor Nod, ya que una mutación en el gen *nodL*, resulta en la pérdida del grupo O-acetilo en todos los lipooligosacáridos estudiados (Spaink y col., 1991).

Esta proteína se encuentra anclada a la membrana citoplasmática (Canter-Cremers y col., 1989).

7.4.5. *nodH*, *nodP* y *nodQ*.

En *R. meliloti* una mutación en el gen *nodH* resulta en la pérdida del grupo sulfato en todos los lipooligosacáridos producidos. Mutaciones en *nodP* y *nodQ* resultan en la producción de una mezcla de factores sulfatados y no sulfatados (Roche y col., 1991), que parece debido a la existencia de una copia adicional de los genes *nodPQ* (Schwedock y Long, 1989).

NodP y NodQ presentan una alta homología con subunidades ATP-sulfurilasas de *E. coli*, indicando que podría ser su función, el generar una forma activada del grupo sulfato (Schwedock y Long, 1990).

La proteína NodH, que guarda homología con una sulfotransferasa (Roche y col., 1991), probablemente transfiera el grupo sulfato de un donador activo a la molécula señal.

7.4.6. *nodS*.

La proteína NodS presenta homología con metiltransferasas. Y así en *Rhizobium* sp. NGR234 y *A. caulinodans*, parece ser responsable de la N-metilación de la cadena acilo (Holsters y col., 1993. Relic y col., 1993). Sin embargo en mutantes NodS⁻ de la cepa NGR234, aunque producen bastante menos cantidad del factor Nod, aparece N-metilado.

El gen *nodS* en la cepa NGR234 le confiere especificidad para nodular *Leucena*: mutaciones *NodS*⁻ resultan *Nod*⁺ en *Vigna*, pero *Nod*⁻ en *Leucena* (Lewin y col., 1990); la transferencia de este gen desde NGR234 a *R. leguminosarum* bv.*trifolii* le confiere un fenotipo *Nod*⁺ *Fix*⁺ en la nueva especie (Krishnan y col., 1992).

7.4.7. *nodI* y *nodJ*.

Basada en sus homologías, las proteínas *NodI* y *NodJ* pertenecen a una familia de proteínas transportadoras y se cree que están implicadas en la secreción del factor *Nod* (Downie, 1991). *NodI* es similar a proteínas que unen ATP (Evans y Downie, 1986) y se encuentra asociada a la membrana citoplasmática (Schlaman y col., 1990). *NodJ* es altamente hidrofóbica y podría representar el componente integrado a la membrana.

Que mutaciones en los genes *nodIJ*, que se presentan comunes en todas las especies de rizobios, no afecten a la nodulación ni a la cantidad del factor *Nod* secretado, parece indicar la existencia de otro sistema de transporte sustitutivo.

7.4.8. *nodO*.

Similar a la hemolisina de *E. coli*, ha sido identificada en *R. leguminosarum* bv.*viciae*, donde parece que complementa la acción de *NodE* (Sutton y col., 1993).

Es una proteína que une calcio y se secreta al medio de cultivo (Economou y col., 1990), interacciona con la membrana plasmática de la célula de la planta y forma canales iónicos.

Mutación en el gen *nodO* presenta un ligero retraso en nodulación.

7.5. Actividad biológica de la molécula señal.

En *R. meliloti* el factor *NodRmIV(S,Ac)*, purificado, presenta actividad biológica a muy baja concentración: induce en alfalfa deformación del pelo radical (a concentración entre 10⁻¹¹-10⁻⁸ M), división de las células corticales y formación del meristemo del nódulo (a concentración de 10⁻⁷ M). Puede incluso inducir la formación de verdaderos nódulos con un

meristemo apical y haces vasculares periféricos, que aparecen igualmente reprimidos por un exceso de amonio (Truchet y col., 1991). Sin embargo en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tras la adición del factor Nod, el desarrollo del meristemo inducido se detiene cuando apenas es externamente visible (Spaink y col., 1991).

En la Figura 5 se muestran los cambios inducidos en la raíz de la planta, por el factor de nodulación secretado por el simbiote.

En plantas de *Vicia*, el factor Nod de *R. leguminosarum* bv. *viciae* induce: deformación del pelo radical, formación de raíces cortas y gruesas, formación de estructuras precursoras del cordón de infección (PIT) (van Brussel y col., 1992), aumenta la producción adicional de flavonoides (INI) (Figura 6) (Recourt y col., 1991), e inicia la transcripción de dos nodulinas tempranas, ENOD5 y ENOD12 (Nap y Bisseling, 1990).

Los requerimientos estructurales del lipo-oligosacárido para inducir sus efectos en la planta, varían dependiendo del hospedador que se trate. La deformación del pelo radical parece ser la respuesta menos específica (Spaink y col., 1991).

La sulfatación de NodRm determina su especificidad para inducir el meristemo sobre *Medicago* (Truchet y col., 1991), sin embargo, previene la deformación del pelo radical en el hospedador heterólogo *Vicia* (Roche y col., 1991). También la cadena acilo es responsable del rango de hospedador en *R. meliloti*, ya que mutantes en los genes *nodeF*, defectivos en la formación de cordones de infección en alfalfa, son capaces de inducir curvatura en los pelos radicales de trébol blanco (Debellé y col., 1986).

La inducción de INI, el meristemo del nódulo y las estructuras precursoras del hilo de infección en *Vicia*, requieren de la presencia de la cadena ácido grasa insaturada (18:4 C) y del grupo O-acetilo (van Brussel y col., 1992).

Derivados lipooligosacáridicos de *R. meliloti* en los que los dobles enlaces de la cadena acilo han sido saturados por hidrogenación, no pueden inducir la formación del meristemo del nódulo en *Medicago*, efecto que también se observa en ausencia del grupo acetilo en el azúcar terminal no reducido (Truchet y col., 1991).

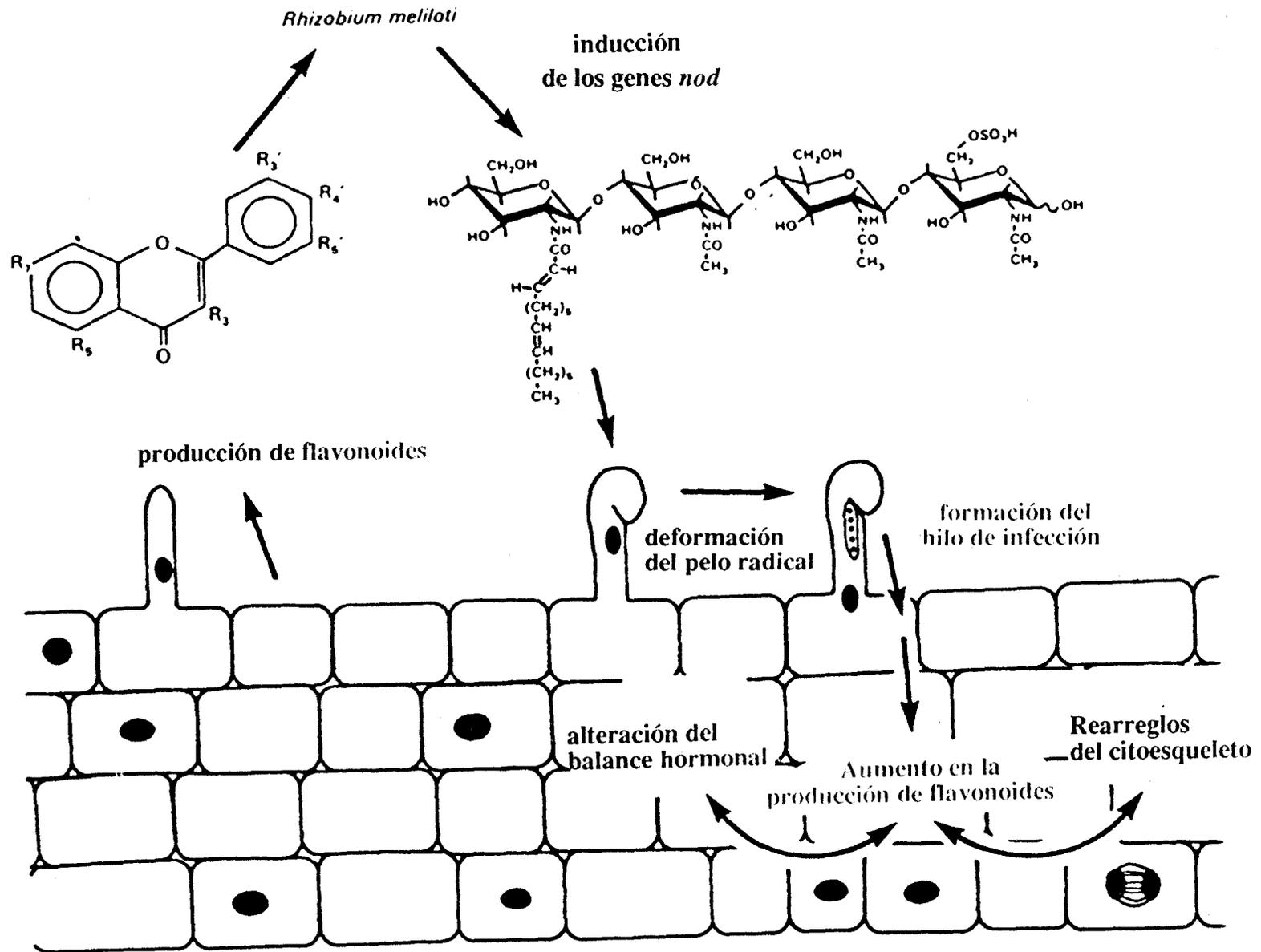


Figura 5.
Actividad biológica de la molécula señal.

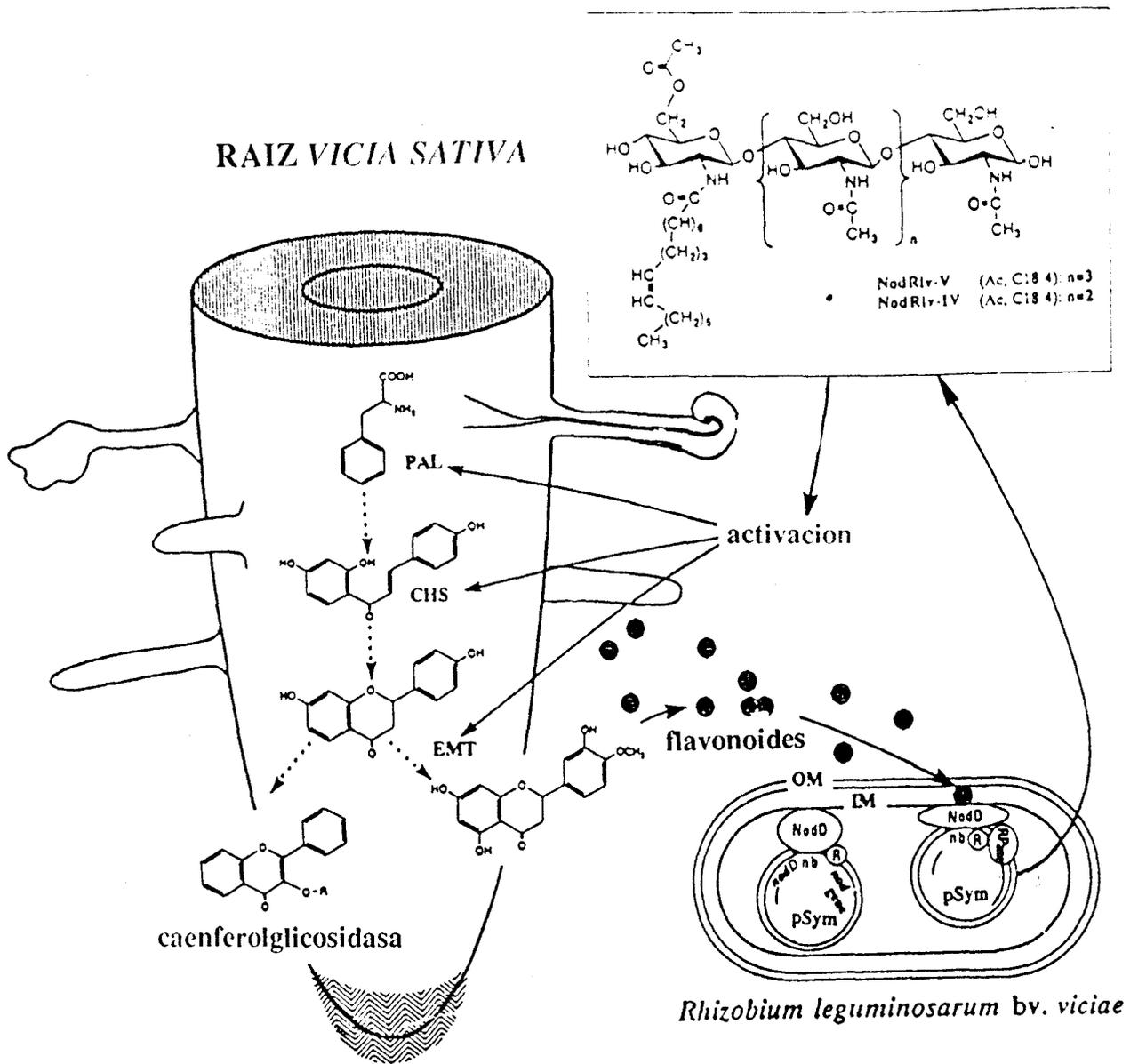


Figura 6.

Respuesta INI entre *R. leguminosarum* bv. *viciae* y su hospedador *Vicia sativa* en las primeras etapas de la infección. PAL, fenilalanina amonioliasa; CHS, chalcona sintasa y EMT, eridictiol metil transferasa (Higashi, 1993).

Los factores pentasacáridicos de *R. meliloti* presentan diferencias en su actividad respecto a los de cuatro unidades: aparecen menos activos en *Medicago* y *Melilotus*, pero más en *Vicia sativa*, hospedador heterólogo de *R. meliloti*. Lo que parece que la longitud de la cadena oligosacáridica es importante para el reconocimiento específico (Schultze y col., 1992).

7.6. Expresión de los genes *nod* en bacteroides.

En el nódulo los genes *nod* no se transcriben, dejan de ser expresados una vez que la bacteria ha pasado desde el cordón de infección a la célula infectada (Schlaman y col., 1991). Altos niveles de una expresión constitutiva de estos genes *nod* en bacteroides resulta en un fenotipo Fix⁻ (Burn y col., 1989).

En bacteroides de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, sólo el gen *nodD* es expresado, aunque en un reducido nivel (Schlaman y col., 1991). En el caso de *R. meliloti*, ni *nodD1*, ni *nodD3* se transcriben, sin embargo la expresión de *syrM* aparece aumentada (Sharma y Signer, 1990).

8. β -GLUCANOS.

Entre los polisacáridos celulares producidos por la familia Rhizobiaceae encontramos los glucanos cíclicos, que aunque normalmente aparecen en el espacio periplásmico de la célula, también pueden ser excretados al medio de cultivo (Breedveld y col., 1990). Parece que intervienen en las primeras etapas de la infección, así como en la adaptación a situaciones de stress hipoosmótico.

8.1. Estructura.

Es un homopolímero de 17 a 25 residuos de glucosa unidas por enlaces β -(1,2), en una configuración cíclica (Amemura y col., 1989). Pueden encontrarse como oligosacáridos neutros o pueden también llevar sustituciones aniónicas: En *R. meliloti* y *A. tumefaciens*, la mayoría de los glucanos aparecen sustituidos con fosfoglicerol (Batley y col., 1987; Miller

y col., 1987) siendo la fracción neutra precursora de la aniónica (Geiger y col., 1991a; Iñón de Iannino y Ugalde, 1989) En *R. leguminosarum* aparecen en su mayoría neutros, aunque a veces pueden presentar como sustituyentes grupos succínicos (Hitsamatsu y col., 1987).

B. japonicum sintetiza glucanos cíclicos compuestos de 10 a 13 residuos de glucosa, con enlaces β -(1,3) y β -(1,6). Son moléculas ligeramente ramificadas, y con sustituciones neutras de fosfocolina (Dudman, 1981. Hitsamatsu y col., 1983).

Sin embargo y a pesar de estas diferencias estructurales, el β -glucano cíclico parece desempeñar las mismas funciones en toda la familia Rhizobiaceae.

8.2. Genes implicados en la síntesis de los glucanos cíclicos.

A partir de los genes *chvA* y *chvB*, responsables de la formación de tumores por *A. tumefaciens* en plantas, se localizaron en *R. meliloti* dos genes: *ndvA* y *ndvB*, homólogos por hibridación (Puvanesarajah y col., 1985. Dylan y col., 1986), funcionalmente intercambiables y de localización también cromosómica. Mutaciones en *ndvA* y *ndvB*, al igual que en *chvA* y *chvB* presentan alteraciones en el transporte y síntesis de los β -glucanos.

En *R. meliloti* *ndvA* ha sido secuenciado, codificando para una proteína de 67,1 Kd, que presenta una muy alta homología con una familia de proteínas bacterianas transportadoras y dependientes de ATP. Entre ellas se encuentra la proteína HylB de *E. coli*, implicada en el transporte de hemolisina, y *Mdr* de células de mamíferos, para el transporte de drogas; con las que *ndvA* presentó el mayor grado de similitud (Standfield y col., 1988). Son proteínas localizadas en la membrana citoplasmática, donde se anclan por su extremo N-terminal.

La función de la proteína NdvA, es de transporte de los β -glucanos a través de la membrana interna y hasta el espacio periplásmico, así mutaciones en *ndvA* no afectan la síntesis de los β -glucanos sino que estos se acumulan en el citoplasma de la célula. (Standfield y col., 1988).

El gen *ndvB* codifica para una proteína de membrana interna, de aproximadamente 319 Kd, que sirve como intermediario en la síntesis de los β -glucanos, uniendo moléculas de glucosa (Zorreguieta y col., 1988).

En *A. tumefaciens* y *R. fredii*, mutaciones en *ndvB* que dan lugar a proteínas de menor peso molecular, siguen siendo igualmente funcionales: el β -glucano sigue siendo sintetizado y la simbiosis con soja es efectiva; lo que parece indicar la existencia de distintos dominios activos en la proteína (Zorreguieta y col., 1988. Bhadwat y col., 1992a).

Estos genes *ndvA* y *ndvB* se encuentran ampliamente conservados entre las especies de *Rhizobium*, manteniéndose la localización cromosómica (Coronado y col., 1989). Y aunque en algunas cepas de *B. japonicum*, no han podido ser identificados (Dylan y col., 1986. Bhagwat y col., 1992a. Cohen y Miller, 1991), lo que indica distinta vía de síntesis de los β -(1,3) y β -(1,6) glucanos, sin embargo, se ha podido demostrar que tras la movilización de *ndvB* de *R. fredii* a *B. japonicum* (ambos simbioses de soja), la proteína puede ser expresada (Bhadwat y Keister, 1992b).

Recientemente ha sido descrita una enzima con actividad glucosil transferasa unida a membrana, que parece estar implicada en la síntesis de β -(1,3) y β -(1,6)) glucanos en *B. japonicum* (Cohen y Miller, 1991).

8.3. Fenotipo de los mutantes y posibles funciones

En *A. tumefaciens* mutantes *ChvA*⁻ y *ChvB*⁻, resultan avirulentos y presentan un defecto de anclaje a las células de la planta (Puvanesarajah y col., 1985). En *Rhizobium* mutantes *Ndv*⁻ también aparecen extremadamente disminuídos en su capacidad de anclaje a la raíz, presentando un fenotipo simbiótico de nodulos blancos, carentes de cordón de infección y bacteroides (Dylan y col., 1986); fenotipo muy similar al presentado por los mutantes *Exo*⁻, a diferencia que éstos no inducen curvatura del pelo radical (Leigh y col., 1985).

La adición de β -(1,2)-glucano de *R. meliloti* durante la inoculación con mutantes *Ndv*⁻, no corrigió su defecto simbiótico, lo que parece indicar que sea requerido una vez los rizobios han alcanzado la planta (Dylan y col., 1990a).

Se observa un crecimiento lento en un medio de baja osmolaridad, defecto que es suprimido al aumentar la concentración de osmolitos del mismo. En cepas silvestres, en condiciones de baja osmolaridad se observa un acúmulo de β -glucanos en el espacio periplásmico, lo que sugiere un papel de osmoadaptación para este polímero, equilibrando la presión osmótica entre citoplasma y espacio periplásmico (Dylan y col., 1990b).

Igual función ha sido descrita para el β -glucano producido por *A. tumefaciens* (Miller y col., 1986) y el oligosacárido derivado de membrana (MDO) de *E. coli* (Bohin y Kennedy, 1984).

Otras alteraciones que reflejan stress o perturbaciones en la superficie externa de la célula son: pérdida de sensibilidad a bacteriófagos, reducción de movilidad y aumento de la sensibilidad a ciertos antibióticos. Todos ellos pueden ser suprimidos al aumentar la osmolaridad del medio, por lo que deben estar relacionados con una adecuada respuesta osmótica (Dylan y col., 1990b).

Estudios de los pseudorevertientes, sugieren que los defectos vegetativos y de osmoregulación son segregados de forma independiente al simbiótico (Dylan y col., 1990a).

La adición exógena de β -glucanos, aislados a partir de las respectivas cepas silvestres, en las interacciones *R. trifolii*-trébol, *R. meliloti*-alfalfa y *R. fredii*, *B. japonicum*-soja, aumenta la cinética de formación del nódulo, así como el número de nódulos formados, indicando un efecto estimulador de los glucanos cíclicos en la simbiosis (Dickstein y col., 1988).

9. LIPOPOLISACARIDOS DE RHIZOBIUM

9.1. Estructura

En la estructura del lipopolisacárido (LPS) de *Rhizobium*, al igual que en Enterobacterias, se distinguen dos regiones: una porción lipídica (lipidoA) y una porción polisacárida, que comprende un núcleo oligosacárido y una cadena de mayor peso molecular o antígeno O

(Figura 7). Por hidrólisis ácida suave pueden ser separados los distintos componentes.

La región polisacáridica del LPS se une covalentemente al lípidoA a través de un azúcar de ocho carbonos llamado ácido 2-ceto-3-deoxioctánico (Kdo)

El lípidoA es la parte hidrofóbica de la molécula, que ancla la estructura completa del LPS a la membrana externa, mientras que la parte polisacáridica se proyecta hacia el exterior de la célula.

La técnica que se sigue para analizar el LPS de bacterias es mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Dodecil sulfato sódico) seguida de tinción con nitrato de plata (Hitchcock y Brown, 1983). Cuando los LPS de *R. leguminosarum* son sometidos a esta técnica, aparecen separados en dos formas posibles: una banda que migra más lentamente o LPSI, que correspondería a la forma completa del LPS; y una segunda banda, de migración más rápida o LPSII, que carece del antígeno O (Carlson y col., 1991). Aunque en otras especies de rizobios puedan aparecer patrones de migración distintos, corresponden a las mismas formas del LPS.

El lípidoA está formado de un esqueleto carbonado glucosídico, generalmente disacárido, al que se unen los ácidos grasos. Entre los rizobios se conocen tres tipos de esqueletos glucosídicos: glucosamina (*R. meliloti* y *R. fredii*), un disacárido de glucosamina-ácido galacturónico (*R. leguminosarum*) y 2,3-diamino-2,3-dideoxyglucosa, sólo o con glucosamina (ciertas especies de *Bradyrhizobium*) (Bhat y col., 1991).

A diferencia de Enterobacterias, el mayor ácido graso que forma parte del lípidoA es el 27-hidroxiocacosanoico, que ha sido encontrado en toda la familia Rhizobiaceae a excepción de *A. caulinodans* (Hollingsworth Carlson, 1989). La longitud de esta cadena ácido graso se extiende en toda la bicapa de la membrana externa y se cree que la interacción de los grupos hidroxilos con componentes de la membrana, incrementan la estabilidad y rigidez de la misma (Carlson y col., 1991)

Otros ácidos grasos encontrados son: ácido 3-hidroxiirístico, que se presenta muy común entre los LPS que han sido estudiados (Carlson y col.,

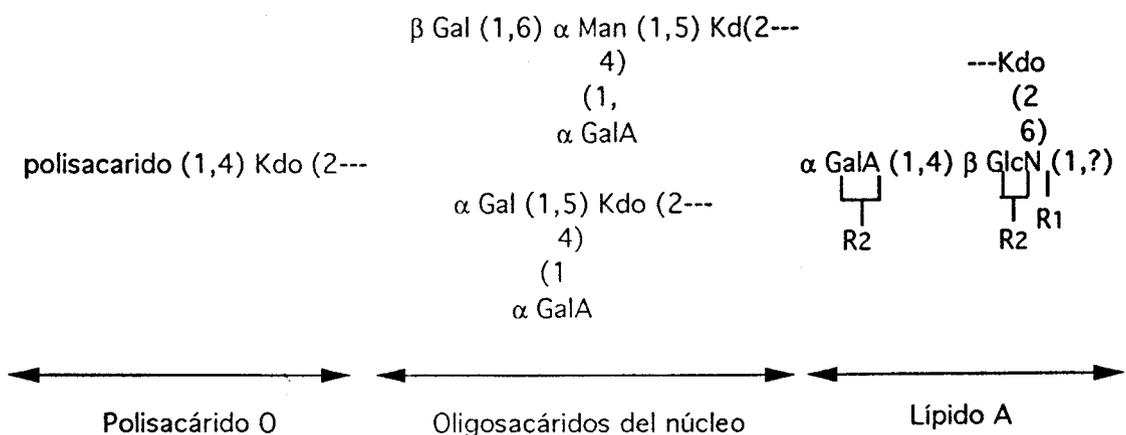


Figura 7.

Estructura del LPS de *R. leguminosarum* (Carlson, 1984). GalA, ácido galacturónico; Man, manosa; Gal, galactosa; GlcN, glucosamina.; Kdo, ácido D-mano-3-deoxyoctulónico. R1 y R2 son ácidos grasos hidroxilados.? indica un sustituyente desconocido .

1987), ácido 3-hidroxi palmítico, 3-hidroxi esteárico, 3-hidroxi pentacosanoico y 29-hidroxi contanoico (Carlson y col., 1987. Bath y col., 1991. Gil-Serrano y col., 1994).

En *R. leguminosarum*, el **núcleo** no presenta residuos de heptosa, que es general entre Enterobacterias. En esta especie el núcleo consta de dos oligosacáridos: un trisacárido y un tetrasacárido; ambos compuestos de galactosa, manosa, Kdo y ácido galacturónico. Esta estructura ha sido encontrada en sus tres biovariedades: *trifolii*, *viciae* y *phaseoli* (Carlson y col., 1989).

En *B. japonicum* el núcleo contiene 4-O-metilmanosa, glucosa y Kdo, componentes que aparecen comunes entre los distintos serogrupos de *Bradyrhizobium* estudiados (Carrión y col., 1990).

En *R. meliloti* y *R. fredii*, el núcleo se presenta muy similar, formado de Kdo y galactosa (Carlson y col., 1991).

El **antígeno O** le dá un carácter antigénico a la molécula de LPS, y presenta una composición muy variada entre las distintas especies de rizobios. Aunque se les considera especies dependientes, entre cepas de rizobios que nodulan un mismo hospedador, se han encontrado estructuras O-polisacarídicas distintas.

En *R. leguminosarum*, es complejo en su estructura y muy variable entre las distintas especies. Aparece como largos fragmentos formados por: residuos glucosídicos metilados, glucosaminas metiladas, heptosas, ácido urónico y terminan en el extremo reductor con una molécula de Kdo (Carlson y col., 1991).

En *B. japonicum*, entre los distintos azúcares que lo componen se encuentran: fucosa, fucosamina, glucosa y quinovosamina (Carrión y col., 1990).

En *R. meliloti* y *R. fredii*, el antígeno O es relativamente corto y aparece formado mayoritariamente por moléculas de Kdo. Otros componentes glucosídicos son: ácido urónico, glucosa y glucosamina para *R. meliloti*; y ácido urónico, glucosa y galactosa para *R. fredii* (Carlson, 1984).

9.2. Genética

Los primeros genes *lps* fueron identificados en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42, a partir de mutantes Ndv⁻ que presentaban un LPS alterado (Noel, y col., 1986). Se han localizado en esta cepa cinco regiones *lps* definidas por clonación de ADN de la cepa CFN42 (Cava y col., 1989).

La región más amplia incluye nueve unidades transcripcionales, localizadas en el cromosoma: *lpsABCDEFGHI*, entre los que se encuentran genes específicos para la síntesis del antígeno O y genes para la síntesis del núcleo oligosacárido (Cava y col., 1990). Mutaciones en esta zona resultan desde cambios en el polisacárido O con núcleo intacto, hasta cambios en el núcleo con pérdida del polisacárido O.

Una segunda región, localizada en un plásmido distinto al plásmido simbiótico, en CFN42, específica para una función conservada entre distintas especies de *R. leguminosarum* (bv. *phaseoli* y bv. *trifolii*) y codifica para enzimas implicadas en la síntesis de la parte central del LPS (Brink y col., 1990).

El gen *lpsγ*, corresponde a otra de las regiones del cromosoma de CFN42, también necesario para la síntesis del núcleo (Cava y col., 1989).

Una mutación en una cuarta región presenta menos LPSI que la cepa silvestre (Cava y col., 1989).

Una última región cromosómica de CFN42 parece estar implicada en la síntesis de LPS y EPS, ya que mutantes en esta región carecen de LPSI y no producen exopolisacárido ácido o EPS (Diebold y Noel, 1989).

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39, han sido identificadas cinco unidades transcripcionales, en una región cromosómica de 15 Kb, implicadas en la síntesis del LPS; mutaciones en esta zona suponen la pérdida del LPS I (Priefer, 1989. Priefer y col., 1992).

En *R. meliloti* mutaciones que afectan la sensibilidad a bacteriófagos, así como el patrón del LPS en geles de poli(acrilamida)-SDS, han permitido localizar genes implicados en la síntesis del LPS en esta especie (Clover y

col., 1989). Así se han definido en la cepa SU47 dos genes que mapean en el cromosoma: *lpsB* y *lpsC*.

En la cepa de *R. meliloti* Rm41, el gen *lpsZ* suprime, mediante la producción de un LPS alterado, el defecto simbiótico en mutantes ExoB⁻ (no productor de EPSI, EPSII y Fix⁻ en la simbiosis con alfalfa). A este fenotipo supresor se le ha llamado Sxb⁺.

Este gen se encuentra localizado en el segundo megaplásmido simbiótico de Rm41 y codifica para una proteína citoplasmática, aunque aún no se sabe si interviene en la síntesis, o en la regulación de la síntesis del LPS (Brzoska y Signer, 1991).

El gen *lpsZ* suprime además otras mutaciones de genes implicados en la síntesis del EPS I, tales como *exoA*, *exoF*, *exoH*, *ExoL*, *exoP* (Williams y col., 1990); parcialmente mutaciones en el gen *exoD* (Reed y Walker, 1991a) e incluso mutaciones que resultan deficientes en EPSII: en los genes *expA* y *expE*. Sin embargo, los mutantes ExoC⁻ y NdvB⁻ resultan ser Sxb⁻.

En *A. tumefaciens*, cuyos genes *exo* son homólogos e intercambiables con los genes *exo* de *R. meliloti* (Cangelosi y col., 1987), se da una situación análoga, ya que mutaciones Exo permanecen generalmente virulentos, a excepción de mutantes ExoC⁻ que son avirulentos. Sin embargo, no ha sido identificado un gen homólogo a *lpsZ* de *R. meliloti* en *A. tumefaciens* (Brzoska y Signer, 1991).

Este fenotipo Sxb⁺, que en la planta produce efectiva simbiosis, se mantiene en todos los hospedadores de *R. meliloti* (*Medicago sativa*, *Medicago trunculata*, *Trigonella caerulea* y *Melilotus officinalis*) (Williams y col., 1990a), a diferencia de la supresión por EPSII que sólo resulta efectiva en alfalfa (Glazebrook y Walker, 1989).

Cuatro genes adicionales: *lpsI*, *lpsN*, *lpsX* y *lpsY*, son requeridos para el fenotipo conferido por el gen *lpsZ*. En *R. meliloti* SU47, cepa que carece de el gen *lpsZ* (*lpsZ*⁰), sí han sido localizados estos otros genes y se ha encontrado que mutaciones en el gen *lpsX* o gen *lpsY* resultan fenotípicamente silenciosas (Williams y col., 1990).

Estos genes supresores *lpsX*, *lpsY*, *lpsI* y *lpsN*, podrían estar relacionados con la región *fix-23* descrita en *R. meliloti* Rm41, ya que mutaciones en esta región, presentan alterado su patrón de resistencia a fagos, así como su LPS (Putnoky y col., 1990).

Recientemente se ha demostrado que esta región interviene en la síntesis de un nuevo polisacárido, rico en KDO. Esta nueva molécula actúa como antígeno de superficie, y resulta análoga al antígeno K del grupo I y II de *E. coli*, el cual se ancla a la membrana por residuos fosfolipídicos. Se cree que los seis ORF localizados en esta región *fix-23* intervienen en la formación de la subunidad lipídica del polisacárido (Petrovics y col., 1993).

9.3. Fenotipo simbiótico de mutantes de lipopolisacáridos.

Se sabe que el papel en la simbiosis del LPS depende de si los nódulos formados por el hospedador son determinados (alfalfa, guisante, trébol, *Leucena*) o indeterminados (frijol o soja). Se observa por el fenotipo presentado por los mutantes, que el LPS, es necesario en ambos tipos de nodulación, a diferencia del exopolisacárido ácido o EPS que parece ser requerido sólo en el caso de nódulos indeterminados.

En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 mutantes que carecen de la banda de más lenta migración o LPSI resultan defectivos en el proceso simbiótico e inducen en frijol: nódulos pequeños, blancos, carentes de bacteroides y de actividad nitrogenasa; el hilo de infección aparece bloqueado en su inicio, a nivel de las células del pelo radical; presentan un tejido vascular central, a diferencia de los canales vasculares laterales que aparecen en el nódulo funcional normal (Noel y col., 1986). Se observa curvatura del pelo radical y actividad meristemática normal durante los primeros días, aunque no ocurre una diferenciación posterior y la nodulación aparece retrasada y con mucha menor eficiencia (Noel y col., 1986).

En *B. japonicum* también se han descrito mutantes en el LPS que en su hospedador determinado, soja, inducen una nodulación defectiva. En la cepa *B. japonicum* USDA110 se han estudiado mutaciones que presentan un LPS truncado y que en uno de los mutantes conduce a ausencia completa de nodulación (Puvanesarajah y col., 1987), y en otro de los

mutantes, a un fenotipo de nódulos blancos, carentes de bacteroides y bloqueados en el cordón de infección, similar al que presentan sobre frijol mutantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

En el caso de hospedadores indeterminados, mutantes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Brink y col., 1990) y bv. *viciae* (Priefer, 1989. de Maagd y col., 1989), que carecen del polisacárido O, inducen una nodulación incompleta. Los nódulos presentan un desarrollo normal del cordón de infección pero, es muy bajo el número de bacterias que infecta las células de la planta. La actividad nitrogenasa es escasamente detectable, los bacteroides son degradados rápidamente y los nódulos senescen pronto (Pühler y col., 1988).

Mientras la presencia del antígeno O parece ser primordial para el establecimiento de la simbiosis, no parece que la estructura del mismo sea un requisito importante. Así mutantes de *R. leguminosarum* bv *trifolii* que carecen del antígeno O han sido complementados con genes de *R. leguminosarum* bv *phaseoli*, para la síntesis de esta estructura y el resultado ha sido la formación de un LPS con un antígeno O característico de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* y a su vez capaz de inducir una efectiva nodulación en trébol, el hospedador normal de *R. leguminosarum* bv *trifolii* (Brink y col., 1990).

Parece ser ,que el LPS no es requerido para el establecimiento de la simbiosis entre *R. meliloti* (Clover y col., 1989) y *R. galegae* (Lipsanen y Lindstrom, 1989) y sus respectivos hospedadores indeterminados, ya que en ambos casos han sido descrito mutantes que presentan un LPS alterado pero que resultan en nódulos fijadores.

Otras alteraciones fenotípicas que presentan los mutantes afectados en el LPS son: las colonias crecidas en medio TY agar aparecen rugosas frente al aspecto liso de la cepa silvestre, aparecen no móviles en medio TY con sólo 0,3% de agar, y en medio TY líquido tienden a precipitar o aglutinar (Noel y col., 1986). También presentan alteraciones en la sensibilidad a compuestos hidrofóbicos (SDS, Tritón, cristal violeta, rifampicina), así como en la sensibilidad a la infección por bacteriófagos (de Maagd y col., 1989).

9.4. Posibles funciones simbióticas

Si mutantes afectados en el LPS no son capaces de establecer una simbiosis efectiva, demuestra la importancia de este polisacárido en el proceso.

Entre sus posibles funciones, se cree que pueda actuar como señal, implicada en un reconocimiento específico, tanto a nivel de receptor fijo a la membrana, como de elicitador difusible (Dazzo y col., 1991), ya que este polisacárido puede ser aislado de sobrenadante de cultivos de rizobios.

Esta función de molécula difusora parece confirmarse en mutantes de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* CFN42 que presentan su LPSI disminuído hasta un tercio de la cantidad normal, y resultando en un fenotipo Ndv- (Cava y col., 1989), lo que indica que una concentración adecuada de LPSI es crítica.

Una inconveniente para confirmar que el LPS pueda servir como señal, es la gran variedad de estructuras O polisacarídicas que son efectivas simbióticamente, ya que incluso se observan distintas entre cepas que nodulan un mismo hospedador (Carlson, 1984). Otra posibilidad sería, que el lípidoA y el núcleo actuaran como señal, mientras que el antígeno O sólo ayudara a la difusión (Noel, 1992).

Otra posible función, ya que el LPS se encuentra formando una capa continua que recubre a la membrana externa de la bacteria, sería de barrera hidrofílica que evita el paso de compuestos tóxicos hidrofóbicos hacia el interior de la célula (Nikaido y Vaara, 1985). También función protectora sería evitar respuestas de defensa del hospedador (Djordjevic y col., 1987).

El LPS también se cree que puede proporcionar una superficie de interacción compatible entre la bacteria y la planta, durante el proceso de endocitosis y así como durante la proliferación de la bacteria en el cordón de infección. Para esta función sería necesario un requerimiento de estructura del LPS, o bien ciertas características hidrofílicas o de carga de la superficie de la bacteria (de Maagd y col., 1989). Este papel parece ser importante en nódulos determinados, donde la bacteria está en contacto directo con la membrana plasmática de la planta, para la formación de un cordón de infección estable.

El LPS parece que contribuye también a la adaptación de la bacteria a las condiciones fisiológicas que se dan en el interior del nódulo (Kannenberg y Brewin, 1989).

9.5. Cambios en la estructura del LPS durante la simbiosis.

Usando anticuerpos monoclonales de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, se ha observado que hay cambios en los epítomos del LPS, durante la diferenciación de la bacteria a bacteroide (Kannenberg y Brewin, 1989. VanDenBosch y col., 1989. Wood y col., 1989). Algunos de estos cambios pueden ser reproducidos fuera de la planta creciendo la bacteria a bajo pH (menor de 5,3), baja tensión de O₂ (menos del 7,5%) o usando succinato como fuente de carbono, condiciones que parecen simular, con efectos independientes, las que se dan en el interior del nódulo (Kannenberg y Brewin, 1989).

Han conseguido aislarse mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* que de forma constitutiva expresan este antígeno característico de bacteroides, y resultan además en un fenotipo Fix⁺. La mutación afecta a una región cromosómica, que es expresada independientemente del gen *nifA* y de otros genes del plásmido simbiótico (Wood y col., 1989). Sin embargo, mutaciones que suprimen la expresión de este antígeno en el nódulo resultan en un fenotipo Fix⁻ (Kannenberg y Brewin, 1989).

Similares resultados han sido encontrados en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 (Tao y Noel, 1990), donde dos antígenos que reconocen al LPS desaparecen durante la nodulación. Estos cambios ocurren sólo en la forma completa del LPS Y pueden ser inducidos *ex planta* en condiciones de bajo pH, baja presión de oxígeno, baja concentración de fosfato disponible, o bien alta temperatura (Tao y col., 1992). Los cambios estructurales del LPS, que conducen a cambios en los epítomos, parece que ocurren en la porción más distal del polisacárido O (Tao y col., 1992).

10. POLISACARIDOS ESTRUCTURALES DE LOS RIZOBIOS.

10.1. Estructura y genética.

Cepas silvestres de rizobios a menudo producen grandes cantidades de exopolisacáridos (EPS) y forman colonias muy mucosas en los medios de cultivo del laboratorio.

Estos EPS ácidos son complejos heteropolisacarídicos de alto peso molecular con una unidad repetitiva compuesta de siete, ocho o nueve residuos de azúcar. La unidad repetitiva u oligosacárido contiene azúcares, generalmente hexosas, unidas por enlaces α y β , bien en forma linear o bien con ramificaciones laterales. Muy a menudo los azúcares llevan sustituyentes como: succinatos, piruvatos y acetatos que le dan el carácter ácido a la molécula (Gray y Rolfe, 1990), y que además parecen ser necesarios para la actividad del EPS en el proceso simbiótico.(Mc.Neil y col., 1986).(Figura 8)

Ha sido propuesto un modelo de síntesis del succinoglicano de *R. meliloti*, que requiere de un "cluster" de 19 genes situado en su segundo megaplásmido (Figura 9 A), y otro de localización cromosómica, *exoC* (De Vos y col, 1986. Finan y col., 1986. Hynes y col., 1986). Se sugiere que, al igual que en otros sistemas bacterianos, la síntesis ocurra con ayuda de un transportador lipídico presente en la membrana citoplasmática, sobre el que se construirá la unidad octosacarídica, empezando con la adición de una galactosa y siguiendo la unión de las restantes glucosas. Al tratarse de un gran polímero, se cree que la polimerización ocurre simultáneamente con la excrección del mismo (Figura 9 B).

Por análisis de mutantes y aislamientos de los compuestos intermediarios de la síntesis del EPS, junto con la información obtenida a partir de la secuenciación de los genes *exo*, se han podido deducir sus posibles funciones biosintéticas:

El gen *exoB*, codifica para una UDP-glucosa-4-epimerasa, que convierte UDP-glucosa en UDP-galactosa (Canter-Cremers y col., 1990. Buendía y col., 1991), ya que la galactosa es el primer azúcar utilizado en

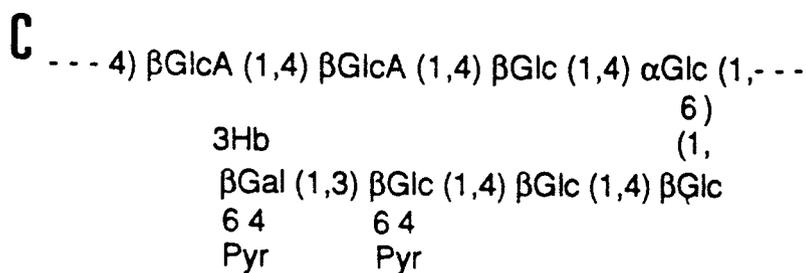
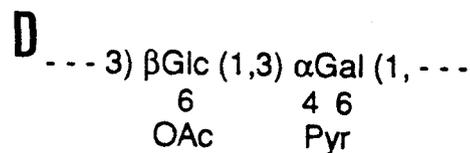
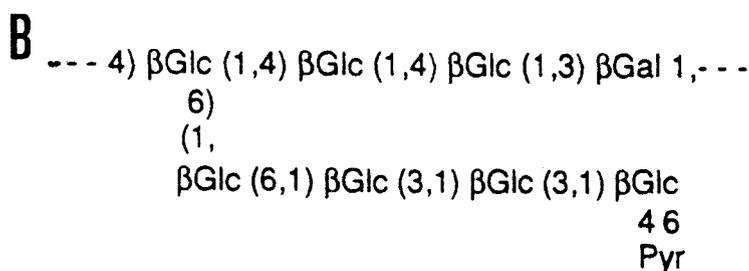
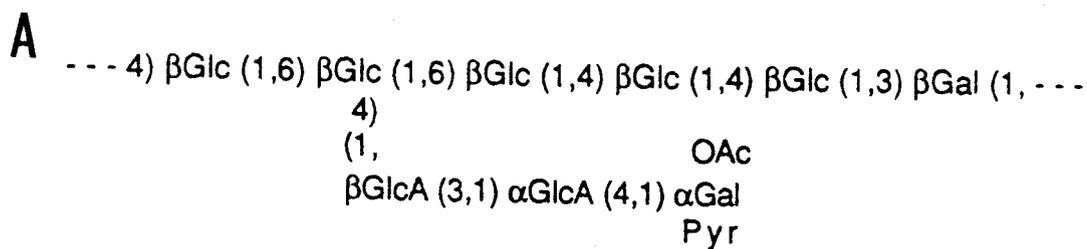


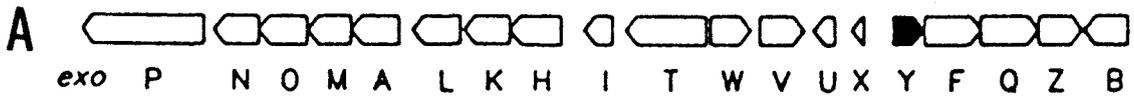
Figura 8.

Estructura química de las unidades oligosacáridicas repetitivas de los EPSs de *Rhizobium* sp. NGR234 (A), *R. meliloti* (B), y *R. l. bv. trifolii* (C). EPSII producido por de *R. meliloti* (D). Glc, glucosa; GlcA, ácido glucurónico; Gal, galactosa; Pyr, piruvato; OAc, O-acetato; 3Hb, 3-hidroxi-butirato.

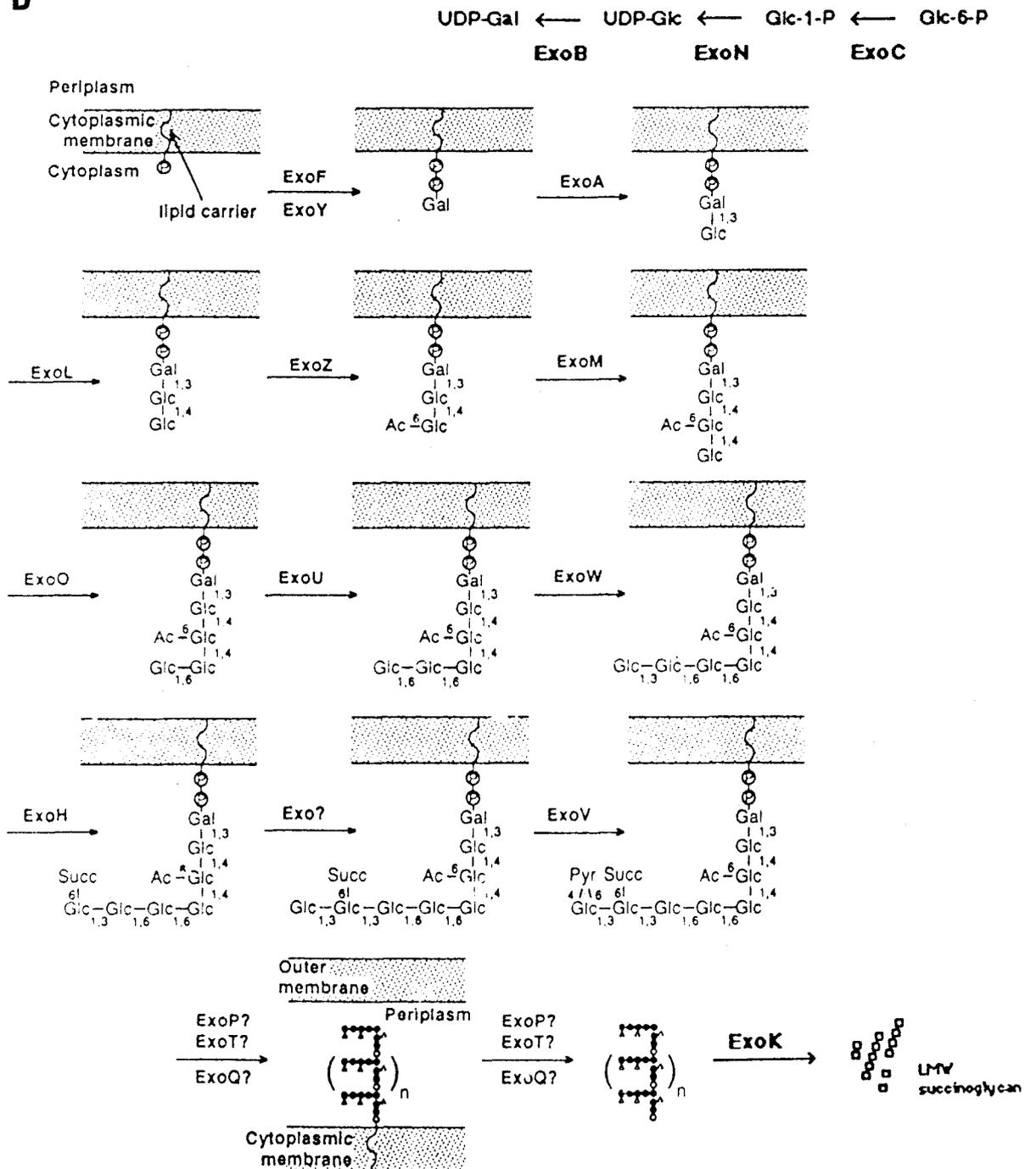
Figura 9.

A. Genes *exo* del segundo megaplásmido de *R. meliloti* que intervienen en la síntesis del EPSI.

B. Modelo propuesto para la biosíntesis y excrección del succinoglucano de *R. meliloti* (Glucksmann y col., 1993).



B



la síntesis, no se observa producción alguna de EPS por mutación de este gen.

Mutaciones en los genes *exoB* y *exoC* (fosfoglucomutasa) (Uttaro y col., 1990), afectan no sólo al EPS sino también al LPS, y al LPS y β -glucano, respectivamente (Leigh y Lee, 1988).

Los genes *exoY* y *exoF* parece que intervienen en las primeras etapas de la biosíntesis (Figura 9 B). Las homologías de secuencia parecen indicar que la proteína ExoY es una galactosa transferasa en *R. meliloti*, y ExoF adicionaría la galactosa al transportador lipídico (Reuber y Walker, 1993b).

Los genes *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoO*, *exoU* y *exoW* codifican glucosas transferasas, que actúan adicionando las sucesivas glucosas. Aún no ha sido identificada la enzima que cataliza la adición de la última glucosa, por lo que se cree que alguna de las transferasas ya identificadas sea responsable.

Mutantes en el gen *exoH* producen polímeros que carecen del sustituyente succinilo (Leigh y col., 1987), se cree que la proteína ExoH usa directamente succinilcoenzimaA para la adición del grupo succinilo al transportador lipídico. Mutaciones en el gen *exoZ* carecen del grupo acetato (Reuber y Walker, 1993a). De lo indicado se deduce que ambos genes son los necesarios para la adición de estos sustituyentes.

Por la homología de la proteína ExoV con la proteína GumL, proteína que transfiere el grupo piruvato a los xantanos, se cree sea ésta la función del gen *exoV* en la síntesis del EPS.

Mutaciones en los genes *exoP*, *exoQ* y *exoT* acumulan subunidades de succinoglucano, no de EPS de alto peso molecular, de lo que se deduce que sean necesarios para la polimerización de las subunidades octosacarídicas o la secreción del polímero completo. Poco se conoce del ensamblaje de las subunidades, aunque se cree que ocurre en el espacio periplásmico de la membrana; al tratarse de un polímero de gran peso molecular es muy probable sea exportado a la vez que es polimerizado (Reuber y Walker, 1993b).

De las homologías encontradas en las secuencias de los genes *exoK* y *exoN*, se cree la proteína ExoK sea una β -1,3- β -1,4 glucanasa excretada (Becker y col., 1993a), que podría intervenir en digerir el EPS en subunidades oligosacarídicas, que podrían ser las formas responsables de su función en la simbiosis (Urzainqui y Walker, 1992), esta actividad endoglucanasa resulta muy específica, ya que el EPS producido por mutantes en el gen *exoH* y que carecen del grupo succinilo, son pobremente digeridos (González y col., 1993)) Por último, la proteína ExoN una UDP-glucosa pirofosforilasa, interviene en las primeras etapas de la síntesis (Reuber y Walker, 1993b).

Rhizobium sp. NGR234 produce un EPS de estructura muy similar al succinoglicano de *R. meliloti* (Figura 8). Zhan y Leigh (1990) han encontrado 5 genes *exo* funcionalmente equivalentes *exoFMALP* y con organización similar en ambas especies.

R. leguminosarum produce un EPS de estructura muy similar para las tres biovariedades.

10.2. EPS II

R. meliloti tiene una capacidad crítica para producir un segundo exopolisacárido, también llamado EPSII o EPSb. Este segundo polisacárido puede corregir el defecto simbiótico de mutantes en genes *exo* y permitir una efectiva nodulación durante la simbiosis en *Medicago sativa* (alfalfa), pero no en ninguno de los otros hospedadores normales de *R. meliloti*, sustituyendo así al EPSI. Esta limitación parece indicar que las características estructurales de los EPS de la bacteria pueden intervenir en determinar el rango de hospedador (Glazebrook y Walker, 1989).

La estructura del EPSII es distinta a la de EPSI (Figura 8), cuya única característica común es un enlace β -(1,3) que une glucosa y galactosa.

Para la síntesis de este segundo exopolisacárido se requiere del producto del gen *exoB*, y seis grupos de complementación que se conocen como *expA*, *expC*, *expD*, *expE*, *expF* y *expG*, que se localizan en el megaplásmido 2 de *R. meliloti*.

Pero la síntesis de EPSII generalmente, no se observa en condiciones normales, sino que ha sido necesario una mutación cromosómica en el gen *expR* o multicopias extras de los genes *exp* del megaplásmido 2, casos en los que se dan una superproducción de EPSII y una disminución de EPSI. Recientemente, se ha observado como el EPSII puede ser también sintetizado en condiciones limitantes de fosfato (Zhan y col., 1991).

10.3. Fenotipo de los mutantes al EPS

Mediante cromatografía del sobrenadante de un cultivo de *R. meliloti*, ha sido posible distinguir dos fracciones, ambas correspondientes al polisacárido ácido EPSI o succinoglicano. Una fracción de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular, ambas de idéntica estructura y cuya principal diferencia es que la fracción de bajo pesos molecular no presentar brillo en un medio con calcofluor (Leigh y Lee, 1988). El calcofluor es un compuesto que se une a los enlaces β -(1,3) y β -(1,4) glucosídicos y fluoresce a la luz UV.

Mutaciones en los genes *exoA*, *exoB*, *exoC*, *exoF*, *exoL*, *exoM*, *exoP*, *exoQ* y *exoT*, se caracterizan por no producir polisacárido ácido; su crecimiento en un medio con calcofluor dá colonias sin brillo y con un fenotipo simbiótico Nod⁺Fix⁻, presentando nódulos blancos, vacíos de bacteroides, donde el cordón de infección aparece bloqueado en las primeras etapas de infección. La curvatura del pelo radical se observa bastante atrasada respecto a la inducida por la cepa silvestre (Norris y col., 1988). Este tipo de nodulación es igual a la observada en mutantes *ndv*, e incluso presentan el mismo espectro de nodulinas (Dickstein y col., 1988). Recientemente ha sido descrita en *R. meliloti* una mutación en *exoP*, que bloquea la producción de EPS de alto peso molecular pero que no afecta la nodulación en alfalfa (Becker y col., 1993b).

Mediante estudios de fusiones con TnphoA y medidas de actividad fosfatasa alcalina, se ha comprobado como las proteínas ExoA, ExoF, ExoQ y ExoP se distribuyen entre la membrana y el espacio periplásmico, indicando que se tratan de proteínas de membrana, que son expresadas específicamente en la zona de invasión del nódulo (Reuber y col., 1991). Que la proteína ExoL no contenga regiones hidrofóbicas sugiere una localización citoplasmática (Becker y col., 1993a).

Mutantes en el gen *exoO* fluorescen en un medio con calcofluor y son noduladores efectivos, sin embargo producen un EPSI de estructura alterada (Becker y col., 1993b)

Mutaciones en el gen *exoN* no afectan a la simbiosis y se cree una segunda enzima pueda sustituir la función de esta proteína (Becker y col., 1993b).

Mutaciones en el gen *exoZ* inducen una nodulación normal en alfalfa, no así en el gen *exoH*, que presenta un fenotipo Nod⁺Fix⁻, con nódulos carentes de bacterias, donde el cordón de infección aparece bloqueado en sus primeras etapas de infección.. De esto se deduce que el grupo succinilo es importante en el papel simbiótico del EPS, no así el grupo acetilo (Buendía y col., 1991. Reuber y Walker, 1993b).

Mutantes en los genes *exoH* y *exoZ* producen succinoglucano de alto peso molecular, lo que indica que los grupos succinilo y acetato, no son necesarios para la polimerización. Mutaciones en el gen *exoH* se caracterizan además por carecer la forma de EPS de bajo peso molecular, y presentar un retraso en la aparición del halo de fluorescencia (Leigh y col., 1987). La secuencia de aminoácidos de ExoH no presenta homología con proteínas de función conocida, sin embargo su estructura indica que se trata de una proteína transmembranal (Becker y col., 1993a).

Mutantes en el gen *exoV*, que carecen del grupo piruvato, no producen prácticamente succinoglucano, por lo que el sustituyente piruvato debe ser necesario para una eficiente polimerización o secreción del succinoglucano. Estos mutantes inducen nódulos vacíos de bacteroides, bloqueados en el cordón de infección (Inf⁻) (Muller y col., 1988).

Mutantes en los genes *exoG*, *exoJ*, *exoK* y *exoN* producen menos EPS que la cepa silvestre, presentando un fenotipo "dim" o de reducida fluorescencia y resultan con nodulación efectiva aunque con una menor eficiencia (Long y col., 1988). Mutaciones en el gen *exoG* carecen además de la forma de alto peso molecular.

Mutantes en el gen *exoD*, tienen reducida fluorescencia en un medio con calcofluor y presentan una producción menor de EPS (Leigh y Lee, 1988). Pero ha diferencia de otros mutantes que también presentan

disminuída la producción de EPS, ExoD⁻, son siempre Fix⁻, con un fenotipo simbiótico muy similar a otras mutaciones *exo*, nódulos fijadores, vacíos de bacteroides, con el cordón de infección que aborta en las primeras etapas de la infección, e igual espectro de nodulinas inducidas. Otra característica de esta mutación es que su deficiente nodulación no puede ser suprimida tras la producción de un segundo polisacárido extracelular EPSII, y sólo ocasionalmente por el alelo supresor *lpsZ*⁺ (Reed y Walker, 1991a).

Parece ser que la deficiencia observada en este mutante se debe a su sensibilidad a condiciones alcalinas, tanto en vida libre como en simbiosis. Esta sensibilidad explica el defecto de ExoD⁻ a nivel de crecimiento en el cordón de infección, que presenta caracter alcalino, y además por la clara evidencia de que su defecto simbiótico puede superarse al tamponar el medio de cultivo (Reed y Walker, 1991).

Genes *exo* de *R. meliloti* se han encontrado en *A. tumefaciens*, con funciones homólogas. Mutantes de *A. tumefaciens* que permanecían oscuros en medio con calcofluor, se pudieron complementar en su producción de succinoglicano con los genes *exoA*, *exoB*, *exoC*, *exoD*, *exoF* y *exoG* de *R. meliloti*. Solo la complementación con *exoC* permaneció avirulenta (Leigh y Lee, 1988).

De *A. zospirillum braziliense*, un fijador de vida libre, se ha aislado una región de ADN que corrige la mutación de los genes *exoB* y *exoC* de *R. meliloti*, respecto a la producción de EPS; en el caso del mutante en el gen *exoB*, incluso se corrige el fenotipo simbiótico (Michiels y col., 1988).

10.4. Funciones biológicas de los exopolisacáridos.

El exopolisacárido ácido parece jugar un papel muy importante en aquellas simbiosis que conducen a la formación de nódulos indeterminados. Esto se observa claramente en la especie de amplio rango de hospedador *Rhizobium* sp. NGR234, donde mutantes Exo⁻ presentan un fenotipo Fix⁻ en *L. leucocephala* (nódulos indeterminados), pero son Fix⁺ en *Macroptillium atropurpureum* (nódulos determinados) (Chen y col., 1985). Similares resultados se obtienen con mutantes Exo⁻ de *R. loti*, efectivos cuando se inoculan a *Lotus pedunculatus* (hospedador determinado), sin embargo, sobre el hospedador indeterminado (*L.*

leucocephala) resultan inefectivos, induciendo la formación de pseudonódulos (Hotter y Scott, 1991).

Mutantes Exo⁻ de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii* son Fix⁻ en guisante y trébol (nódulos indeterminados) respectivamente, pero idéntica mutación en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (nódulos determinados) resultan Fix⁺ (Diebold y Noel, 1989).

En *R. fredii*, bacteria que forma nódulos determinados en soja, los mutantes que carecen de EPSI son también Nod⁺ Fix⁺ (Kim y col., 1989).

EPSI de bajo y alto peso molecular, tienen una misma función en la simbiosis, ya que mutantes en el gen *exoG*, de *R. meliloti*, que sólo presentan EPSI de bajo peso molecular, forman nódulos fijadores en alfalfa aunque con menor eficiencia que el silvestre. La ausencia de grupos succinilos está relacionada con la ausencia de EPS de bajo peso molecular (Reuber y col., 1991).

Otras posibles funciones del EPS incluyen: facilitar el anclaje de la bacteria a la superficie de la raíz; servir como transportador de enzimas e incluso de la molécula señal; formar parte de la matriz del cordón de infección; evadir o suprimir posibles respuestas de defensa de la planta. Respecto a esta última función es interesante que β -(1,3)-glucanasas están entre las enzimas hidrolíticas producidas cuando la planta es expuesta a patógenos, y que la unión β -(1,3) se encuentra en ambos polisacáridos: EPSI y EPSII (Kombink y col., 1988).

El EPS parece jugar un claro papel a nivel de especificidad: en estudios de transconjugantes de *Rhizobium* sp. NGR234, los genes *exo* deletados han sido sustituidos por los genes *exo* de *R. meliloti*, el EPS producido por la cepa híbrida tiene la estructura de succinoglucano y es capaz de inducir el desarrollo de nódulos en *L. leucocephala*. Sin embargo estos nódulos no contienen cordones de infección, ni bacteroides, lo que indica el requerimiento de un EPS homólogo para un fenotipo Nod⁺Fix⁺ (Gray y col., 1991).

10.5. Estudio de los polisacáridos en bacteroides.

Se observa en el nódulo como la transformación a bacteroide, va acompañada de una supresión en la producción del EPS. Parece ser que son las condiciones del nódulo las que estimulan esta respuesta, el tejido central es esencialmente anaeróbico, requerido para la actividad de la nitrogenasa. Un crecimiento de *B. japonicum* a baja tensión de oxígeno, tanto en vida libre como en nódulo, permitió observar una igual producción de EPS en ambos casos (Tully y Terry, 1985), lo que parece indicar que el oxígeno sea un regulador de los genes *exo*.

10.6. Regulación de los genes de exopolisacáridos.

En *R. meliloti* han sido identificado dos genes cromosómicos: los genes *exoR* y *exoS*, implicados en la regulación de la síntesis del EPSI. Mutaciones en estos genes originan colonias que fluorescen extremadamente en calcofluor, debido a un considerable aumento en la producción de exopolisacárido.

El gen *exoR*, parece estar relacionado con captar los niveles de nitrógeno del medio, ya que mutaciones en este gen sintetizan EPSI de forma constitutiva en presencia o ausencia de nitrógeno (Doherty y col., 1988). También parece que la actuación del gen *exoR* es a nivel de transcripción de genes *exo*, excepto para el gen *exoB* (Reed y Walker, 1991).

Mutantes en el gen *exoS* forman nódulos Fix⁺ en alfalfa, por el contrario mutaciones en el gen *exoR* dan ambos tipos de nódulos Fix⁺ y Fix⁻ (Doherty y col., 1988).

Mutaciones en estos genes reguladores son letales en combinación con otras mutaciones *exo*, tales como *exoL*, *exoM*, *exoQ* y *exoT*. Esto sugiere que mutaciones que bloquean la producción de exopolisacárido pueden causar una acumulación tóxica, en estas cepas sobreproductoras de EPSI. Dobles mutantes en los genes *exoU*, *exoV* y *exoW* sólo presentan un crecimiento más lento (Reuber y Walker, 1993b).

En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* se encontró otro gen inhibidor de la síntesis de EPS, llamado *psi* (Borthakur y col., 1985), genes homólogos

han sido encontrados en otras especies de la familia Rhizobiaceae: el gen *psdA* en *A. tumefaciens* (Kamoun y col., 1989), el gen *exoX* en *Rhizobium* sp. NGR234 (Gray y col., 1990) y el gen *exoX* en *R. meliloti* (Zhan y Leigh, 1990). La característica común de estos genes es que cuando son clonados en plásmidos multicopias y transferidos a sus respectivas cepas silvestres de *Rhizobium*, los transconjugantes son Exo⁻. En la Figura 10 se muestra un resumen del distinto comportamiento simbiótico y en cuanto a producción de EPS, de mutaciones que afectan a genes regulatorios.

Del análisis de las secuencias del gen *exoX* de *Rhizobium* sp. NGR234 y del gen *psi* se deduce que los dos genes codifican proteínas de igual tamaño.

El efecto inhibitorio del gen *psi* y del gen *exoX* puede ser suprimido por otra clase de genes reguladores: el gen *pss2* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Borthakur y col., 1988), el gen *exoY* de *Rhizobium* sp. NGR234 (Gray y col., 1990) y el gen *exoF* de *R. meliloti* (Zhan y Leigh, 1990).

La inhibición de EPS causada por los genes *psi/exoX* en multicopia se contrarresta con un igual número de copias de los genes *pss2/exoY/exoF*.

Por análisis de secuencia de los genes *exoY* y *pss2* son homólogos. Por otro lado, mediante estudios de mutantes, el gen *exoF* es equivalente al gen *exoY*.

Las mutaciones de los genes *pss*, *exoY* o *exoF* implica pérdida de la producción de EPS y de nodulación en sus respectivos hospedadores (guisante, Leucena y alfalfa).

Los genes *exoX* y *pss2* no inhiben la transcripción del gen *exoX* (Gray y col., 1990) y del gen *psi* (Borthakur y col., 1988). En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* la transcripción del gen *psi* es reprimida por un tercer gen: *psr* (Borthakur y Johnston, 1987), sin embargo una mutación en el gen *psr* resulta en una reducción pero no en una absoluta pérdida en la producción de EPS, y además establecen una simbiosis totalmente efectiva en judías. (Borthakur y Johnston, 1987).

Parece ser que los productos de los genes *pss2*, *exoY* o *exoF* forman el componente central de un complejo que regula la producción de EPS. Las

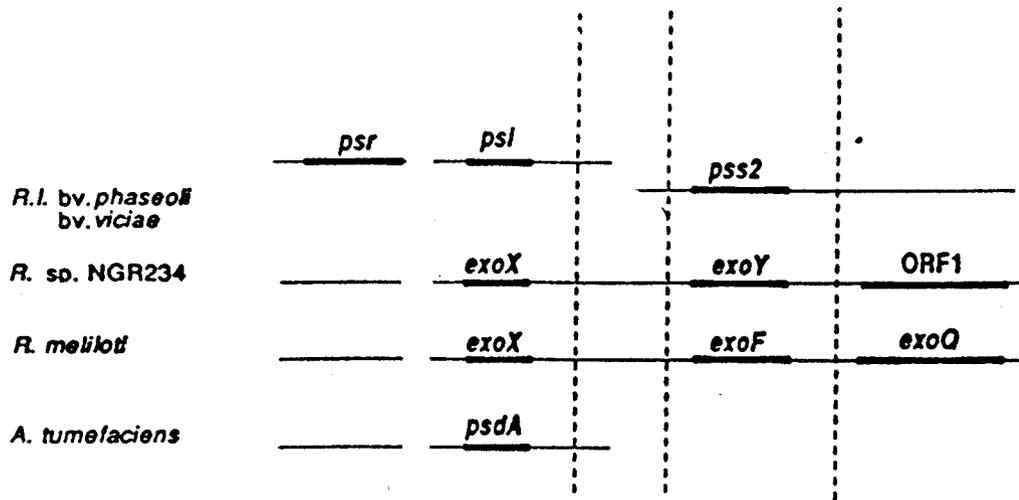


Figura 10.

Genes reguladores de la síntesis del exopolisacárido identificados entre las distintas especies de la Familia Rhizobiaceae (Gray y Rolfe, 1990).

proteínas de los genes *psi* o *exoY*, actuarían regulando el complejo mediante una unión reversible (Gray y col., 1990).

En *R. meliloti*, la transcripción de *exoF* es reprimida por los genes reguladores *exoS* y *exoR*. (Doherty y col., 1988).

En cepas de *R. fredii* y *Rhizobium* sp. NGR234, el gen *nodD2* inhibe la síntesis de EPS, cuando es introducido en multicopias. El gen *nodD2* puede actuar en una forma similar al gen *exoX*, como una subunidad inhibitoria del complejo (Appelbaum, 1988)

El gen *syrM*, que en la simbiosis *R. meliloti*-alfalfa, puede aumentar la expresión de los genes *nod*, puede también estimular la expresión de los genes *exo*, en una acción conjunta con otro locus, tal como el gen *syrA* (Long y col., 1989. Mulligan y Long, 1989).

11. POLISACARIDO RICO EN KDO.

Recientemente en *R. fredii* y *R. meliloti* se ha encontrado un nuevo polisacárido de superficie, distinto del clásico LPS, rico en ácido 3-deoxy-D-manno-octulosónico, y aunque se supone interviene en el proceso simbiótico, su función no es aún conocida.

En *R. fredii* USDA205, la estructura primaria de este nuevo polisacárido ya ha sido determinada, se muestra en la Figura 11, y aparece homóloga a la de una clase de polisacáridos ácidos capsulares de *E. coli*, de características antigénicas y que parecen jugar un papel en su patogenicidad. La estructura consta de unidades repetitivas de (-3)- α -Galp-(1-5)- β -D-Kdop-(2-)_n (Reuhs y col., 1993), ancladas a la membrana por una unidad fosfolipídica.

La detección de este componente lipídico es extremadamente difícil por la pequeña proporción en que aparece, respecto a la parte polisacarídica, y también por los procedimientos de extracción, que obtienen el polisacárido sin el anclaje lipídico (Petrovics y col., 1993).

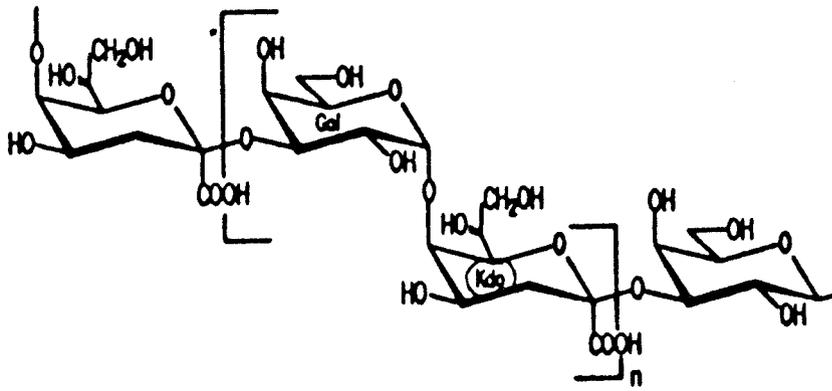


Figura 11.

Estuctura primaria del polisacárido rico en Kdo, a partir de la cepa de *R. fredii* USDA205 (Reuhs y col., 1993).

También en *A. tumefaciens* se han encontrado evidencias de un lipopolisacárido rico en KDO, que puede diferenciarse del LPS ya conocido, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida seguidos de tinción de plata y azul alciano (Corzo y col., 1991).

La ya conocida región *fix-23* identificada en *R. meliloti* 41 y que se sabe permite una efectiva nodulación en mutantes *exo* de esta cepa y que en *R. meliloti* SU47 resultan *Fix*⁻, parece estar implicada en la síntesis de este nuevo polisacárido. En una de las cuatro unidades de complementación de esta región cromosómica, se han encontrado seis ORFs, que transcriben en la misma dirección. Las proteínas para las que codifican, muestran una estrecha homología con ácido graso sintasas (FAS) y poliquétidos sintasas (PKS) de distintos organismos, e incluso presentan una organización similar (Petrovics y col., 1993), por lo que se cree, puedan intervenir en la síntesis de la región lipídica de este polisacárido.

A pesar de esta estrecha homología, las funciones específicas para las que codifica la región *fix-23*, no pueden ser sustituidas por los sistemas esenciales de síntesis de ácidos grasos de la bacteria.

Otros genes (*lps X*, *lps Y* y *lps Z*) ya reportados como supresores de mutaciones *exo* en *R. meliloti* cepa Rm41 y cuyas mutaciones resultaban en cambios en la estructura del LPS (Putnok y col., 1990. Williams y col., 1990a y b) podrían también estar relacionados con este polisacárido rico en KDO, ya que las técnicas usadas en estos estudios no lo distinguen del LPS clásico (Petrovics y col., 1993).

Respecto a la posible relación entre la región *fix-23* y el gen *lps Z*, para el que se sugiere es un regulador de genes *lps*, se sabe sin embargo, no regula la expresión de la región *fix-23* (Petrovics y col., 1993).

La adición de EPS, aislado de la cepa silvestre, a mutantes dobles (*exo B*, *fix-23*) de Rm41 que resultan *Fix*⁻, parece restaurar parcialmente su capacidad fijadora. Esto podría indicar la existencia de regiones comunes y funcionalmente equivalentes en ambos polisacáridos (Petrovics y col., 1993).

A diferencia de lo observado con la expresión de los genes *nod*, una vez la bacteria ha pasado a invadir la célula vegetal, no existen cambios en la expresión de los genes de la región *fix-23* entre los estados de vida libre y bacteroide (Petrovics y col., 1993).

12. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES AUXOTROFICAS QUE INFLUYEN EN LAS CARACTERISTICAS SIMBIOTICAS

Los mutantes auxótrofos han sido utilizados de forma tradicional como marcadores genéticos, en: estudios de métodos eficaces de mutagénesis en cepas de *Rhizobium* (Walton y Moseley, 1981. Meade y col., 1982); estudio de vehículos y técnicas de transferencia de material genético entre las distintas especies de *Rhizobium* (Johston y col., 1978. Pilacinski y Schmidt, 1981. Klein y col., 1992); mapeo cromosómico (Casadesús y Olivares, 1979. Kondorosi y col., 1980. Hooykaas y col., 1982. Megías y col., 1982).

También el estudio de mutantes auxótrofos y de sus características simbióticas es una forma de determinar los requerimientos metabólicos, necesarios para el establecimiento de una simbiosis efectiva.

12.1. Relación entre requerimientos nutricionales y propiedades simbióticas.

En el estudio de cepas auxótrofas, ineficaces simbióticamente, se utilizaron una serie de técnicas genéticas encaminadas a determinar que un requerimiento nutricional sea el responsable de un defecto simbiótico, así como que una sólo mutación sea responsable de ambas alteraciones. Estas técnicas se resumen en: mutaciones supresoras (Noel y col., 1988), complementaciones con ADN de la cepa silvestre (Kerppola y Kahn, 1988. Noel y col., 1988. Aguilar y Grasso, 1992. Jelesko y col., 1992), y análisis de revertientes de la mutación a la cepa silvestre (Truchet y col., 1980. Noel y col., 1988. Aguilar y Grasso, 1991).

Son muchas las mutaciones auxótrofas, asociadas a defectos simbióticos que han sido estudiadas en las especies de *Rhizobium* (.Schwinghamer, 1970. Scherrer y Denarié, 1971. Pain, 1979. Wells y

Kuykendall, 1983. Sadowsky y col., 1986. Kim y col., 1988. Noel y col., 1988), siendo las más interesantes aquellas que conllevan una deficiencia en la nodulación (asparagina, arginina, leucina, metionina, tirosina y antranilato), o una ausencia total de nodulación: como la mutación *ilvC* en *R. meliloti* (Aguilar y Grasso, 1991), o auxotrofia a la histidina en *B. japonicum* (Sadowsky y col., 1986. So y col., 1987)

El fenotipo simbiótico de una determinada auxotrofia es variable dependiendo del lugar de la ruta metabólica que quede afectado por la mutación. Un claro ejemplo son los distintos auxótrofos de triptófano aislados en *R. meliloti*: es la mutación de la primera enzima de la ruta biosintética (antranilato sintasa), la que conduce a la formación de nódulos inefectivos, sin embargo, mutación en cualquier otra de las enzimas de la ruta implica auxotrofia pero no afectan a la nodulación.

12.2. Recuperación de las propiedades simbióticas alteradas por las auxotrofías.

Schwinghamer (1970) describe la total restauración de la eficacia de fijar nitrógeno en una cepa *Rib⁻* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tras la adición de riboflavina al sistema *R. leg.* bv. *trifolii*-trébol. Un mutante Adenina (*Ade⁻*) de *R. leguminosarum* bv. *viciae* avirulento para guisantes tipo "Home freezer", llega a formar nódulos tras la adición de adenina, aunque la efectividad no está totalmente restaurada (Pankhurst y Schwinghamer, 1974). La adición de L-leucina o compuestos intermedios de su síntesis, a una cepa mutante a la leucina (*Leu⁻*) de *R. meliloti*, restauró completamente la efectividad (Truchet y col., 1980).

Estos resultados indican una relación bioquímica directa, entre las alteraciones metabólicas y sus propiedades simbióticas, en estos mutantes auxótrofos. También es claro que en el caso de auxótrofos de riboflavina y leucina, los productos finales intervienen directamente en la simbiosis.

Sin embargo, en otros casos de auxotrofia no se ha podido recuperar la capacidad de fijación, tras la adición de productos intermedios, o del producto final. Como por ejemplo los mutantes a las purinas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* estudiados por Noel y col.(1988), mutantes de *R. meliloti* a isoleucina-valina (*Ilv*) (Aguilar y Grasso, 1991), así como

distintas auxotrofías estudiadas en *R. fredii*: tales como ácido nicotínico, aspartato, adenina, uracilo, isoleucina y valina (Kim y col., 1988).

Que entre todos los auxótrofos estudiados, no todos presenten un fenotipo no fijador, como los de glutamato, serina, glicina, glutamina y la mayoría de los de triptófano (Kerppola y Kahn, 1985. Kraus y Kahn, 1988. de Bruijn y col., 1989. Barsomiam y col., 1992), sugiere que estos compuestos pueden ser obtenidos por la bacteria "in planta" o bien que no sean requeridos en el proceso de fijación. Completamente distintas, se presentan las auxotrofías a purinas y pirimidinas, que parecen ser fundamentales para el desarrollo del nódulo, y que en ningún momento parecen ser suministradas por la leguminosa.

12.3. Características de los nódulos inefectivos.

En aquellos estudios de auxótrofos que se han acompañado de microscopía, se ha podido determinar en qué paso del desarrollo del nódulo son requeridos ciertos nutrientes, tanto aminoácidos como nucleótidos.

Pankhurst y col. (1972) estudiaron la estructura y la capacidad fijadora de nódulos de raíz inducidos por un mutante Rib⁻ de *R. legum. bv. trifolii*. Una gran cantidad de bacterias en la célula vegetal falla en la transformación a bacteroide, y los niveles de reducción de etileno eran muy bajos. La adición de riboflavina a diferentes intervalos después de la inoculación, mostró que el requerimiento de este compuesto era particularmente importante de uno a tres días después de la formación del nódulo, es decir, a nivel de formación del bacteroide y no de crecimiento vegetativo del nódulo.

En el estudio de los pseudonódulos inducidos por auxótrofos de adenina de *R. leguminosarum*, el proceso queda bloqueado en el desarrollo del cordón de infección, y las bacterias no logran infectar la célula vegetal, sin embargo, tras la adición al tercer-sexto día de adenina, se observa un mayor desarrollo del nódulo, pero no se logran ver células vegetales infectadas (Pankhurst y Schwinghamer, 1974).

Los mutantes Leu⁻ de *R. meliloti* estudiados por Truchet y col. (1980), inducen en alfalfa nódulos pequeños, esféricos y blancos, carentes de actividad nitrogenasa; la actividad meristemática aparece limitada y la

bacteria no llega a infectar la célula vegetal. Tras la adición de L-leucina o precursores, la bacteria invade la célula vegetal y se observa multiplicación y transformación en bacteroides, resultando nódulos con una pigmentación roja por la leghemoglobina, fijadores de nitrógeno.

Estudios de auxótrofos en *R. fredii* a ácido nicotínico y aspartato, inducen nódulos maduros como los de la cepa silvestre, pero que carecen de la pigmentación rosada y por tanto no fijadores (Kim y col., 1988).

Los auxótrofos Pur⁻, Pyr⁻ descritos en *R. legum. bv. phaseoli* CFN42 por VanDenBosch y col. (1985), presentan un fenotipo Ndv⁻, donde el inicio de la infección ocurre normalmente: colonización, curvatura y división de las células corticales; pero aparece bloqueado a nivel de desarrollo del hilo de infección y finalmente resultan en una deficiente nodulación.

Mutantes de *R. meliloti* afectados en la enzima antranilato sintasa y que resultan auxótrofos a triptófano, inducen en alfalfa nódulos alargados y blancos, donde las primeras etapas del proceso simbiótico aparecen normales, pero anormales en su zona de invasión, que aparece mucho más extendida que en la cepa silvestre; algunos de ellos presentan una pequeña zona rosada en su base y capacidad para reducir acetileno (Barsomian y col., 1992).

Schwinghamer (1967 y 1970) determinó alta especificidad en la interacción bacteria-hospedador a nivel metabólico. Un mutante Rib⁻ de *R. legum. bv. trifolii* produce diferentes respuestas en diferentes plantas: resulta inefectivo con dos cultivares de *T. subterraneum* (Tallarook y Woogenellup) y efectivo en otro (Mount Barker) y cuando se adiciona la riboflavina se restaura la efectividad.

13. *R. tropici* CIAT899

Phaseolus vulgaris (frijol) es un cultivo de gran importancia económica y que actualmente se encuentra muy extendido. Fue introducido desde México a España en el siglo XVI y es en su paía de origen donde existen mayor número de especies y variedades silvestres.

En el proceso simbiótico, *P. vulgaris* se comporta como un hospedador muy permisible, siendo nodulado efectivamente por un amplio rango de bacterias, incluso por rizobios aislados de leguminosas tropicales no relacionadas (Bromfield y Barran, 1990).

Del heterogéneo grupo formado por todos los rizobios aislados de nódulos de *P. vulgaris* y que quedaban englobados en la biovar *phaseoli* de *R. leguminosarum*, Martínez y col. (1991), han definido una nueva especie a la que han llamado *R. tropici*, aunque en un principio se le denominó *R. legum. bv. phaseoli* tipo II.

Esta especie tiene como características diferenciales del grupo hasta entonces incluido: tener una sóla copia del gen *nifH*, no hibridar con el gen regulador *psi* y tener un rango de hospedador que incluye además de *P. vulgaris* a *Leucaena* spp. (*Leucaena*) y *Macroptilium atropurpureum* (*siratro*) (Martínez y col., 1988).

La definición dada por Martínez y col. (1988) para esta nueva especie, es de bacterias aeróbicas, gram-negativas, con forma de bastón, flageladas y no formadoras de esporas, con un tamaño de 0,5 a 0,7 por 1,5 a 2 μm . Formador de colonias circulares, convexas, semitraslúcidas y de un diámetro de 2 a 4 mm en 2-4 días en medio sólido PY. Con un pH óptimo de crecimiento de 5 a 7, y temperatura máxima de crecimiento de 40°C. Todas las cepas del grupo son resistentes a ácido nalidíxico, nodulan y fijan nitrógeno en *P. vulgaris*, y *Leucaena* spp.

Presentan otras características como el ser genéticamente estables y retener sus plámidos después de una prolongada incubación a 37°C. Algunas cepas son tolerantes al calor y resistentes a la acidez y aluminio del medio (Karanja y Wood, 1988. Vargas y Graham, 1988).

En ensayos de competitividad, aparece como menos competitiva que otras cepas de *R. legum. bv. phaseoli* (Martínez y Rosenblueth, 1990), sin embargo condiciones de bajo pH favorecen la ocupación del nódulo por *R. tropici* (Vargas y Graham, 1989. Streit y col., 1992).

R. tropici parece englobar dos tipos de bacterias: tipo A y tipo B. Las diferencias que las separan son:

Tipo A	Tipo B
Necesitan Ca ²⁺ para crecer en PY	No necesitan Ca ²⁺
No crecen en medio LB	Crecen en medio LB
Forman colonias blancas en YEM	Forman colonias húmedas y traslúcidas en YEM
No móviles en agar al 0,3%	Móviles en agar al 0,3%
T ^a max.de crecimiento: 35-37°C	T ^a max.de crecimiento: 40°C

La cepa CIAT299 se ha considerado la especie representante del grupo tipo A y la cepa CIAT899 la del grupo tipo B.

R. tropici CIAT899 es actualmente una especie ampliamente estudiada y tiene la peculiaridad de que transconjugantes de *A. tumefaciens* portadores de su plásmido simbiótico, pueden promover un proceso simbiótico efectivo y totalmente diferenciado, cuando son inoculados en plantas de frijol. No ocurre así con el plásmido simbiótico de *R. legum. bv. phaseoli* (Martínez y col., 1987).

Otras características que definen a CIAT899 son sus resistencias a cloranfenicol, espectinomina, carbenicilina y estreptomina; así como a los metales pesados: Ni, Pb, Co, Cu, Ag y Cr (Martínez y col., 1991).

Laguerre y col. (1993) han comprobado recientemente que *R. tropici* y *R. etli* (antes *R. leg. bv. phaseoli* CFN42) son especies ubicadas exclusivamente en el continente americano.

13.1. Genes de nodulación y molécula señal.

La organización de los genes *nod* en CIAT899, se presenta similar a la encontrada en *R. meliloti* y *R. leg. bv. trifolii* y *viciae* (Martínez y col., 1990). Vargas y col.(1990) localizaron una región del plásmido simbiótico, donde se encuentran los genes *nodABC* y adyacentes a ellos un gen *nodD* responsable de la especificidad de hospedador (Sousa y col., 1993) mediante ensayos de hibridación también identificaron los genes *nodE* (a 19 Kbs de *nodABC*) y *nodIJ*. Folch y col. (1994), identificaron los genes

nodPQHS por hibridación con sondas heterólogas de *R. meliloti* y *Azorhizobium caulinodans* (Ver Figura 12 A)

CIAT899 presenta al menos 5 copias el gen *nodD*, todas ellas en el plásmido simbiótico, aunque no están formando un cluster. Una de estas copias (*nodD1*), la adyacente al operón formado por los genes *nodABC*, parece ser la más activa en la inducción de los genes *nod* (van Rhijn y col.,1993. Sousa y col., 1993)). Este modelo de activación de los genes *nod* que se sugiere en *R. tropici*, aparece similar al que sigue *Rhizobium .sp.* NGR234, donde una de las dos copias del gen *nodD* es la que interviene en la regulación y en el reconocimiento a los flavonoides (Broughton y col., 1990).

Sousa y col. (1993), han demostrado que un fragmento 521 pb del pSym de *R. tropici* CIAT899, que lleva 128 aminoácidos de la región amino-terminal del gen *nodD*, y también secuencia de una caja de nodulación, ambas divergentemente orientadas, introducido en cepas de *R. etli* CFN42y *R. trifolii*, amplían su rango de hospedador, siendo ahora capaces de nodular *L. esculenta* y *P. vulgaris* respectivamente.

Ha sido estudiada la estructura el factor Nod producido por *R. tropici* CIAT299: está formado por un esqueleto de subunidades pentasacarídicas de N-acetilglucosamina, con el residuo terminal de glucosamina no reducido N-metilado y N-acilado (ácido cis-vaccénico); en el carbono 6 de la glucosamina reducida puede o no, llevar un sustituyente sulfato (Poupot y col.,1993) (Figura 12 B)

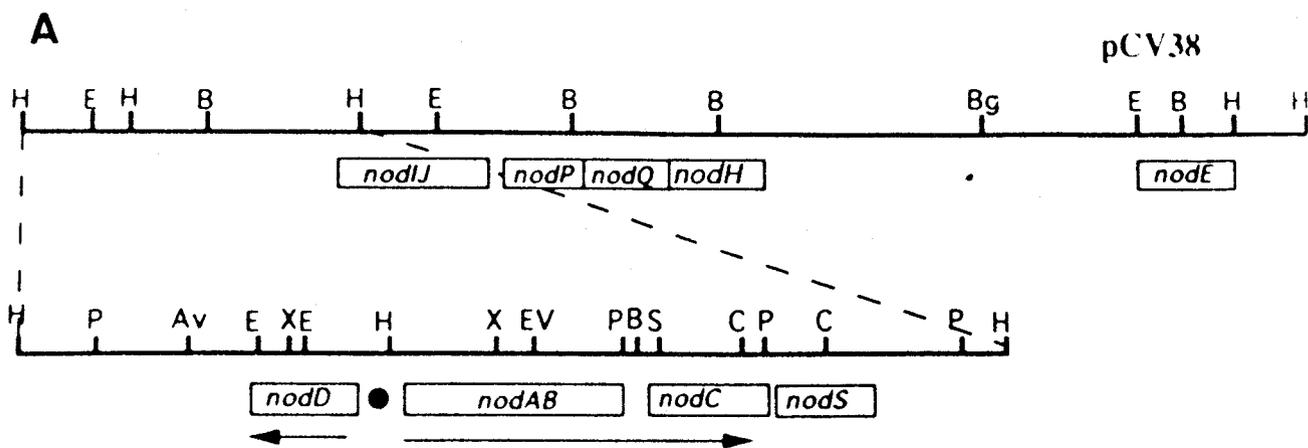
El gen *nodH*, responsable de la sulfatación del factor Nod en *R. meliloti*, y el gen *nodS*, que en *A. caulinodans* N-metila el factor Nod, han sido encontrados por hibridación en el pSym de CIAT299 (Poupot y col., 1993).

De la mezcla de factores producidos por *R. tropici*, se ha comprobado que es el sulfatado el más activo, induciendo la formación de estructuras como nódulos, pero donde el meristemo nodular se encuentra menos desarrollado. Cuando los dos factores, sulfatados y no sulfatados, se encuentran presentes, no se obtiene una mejor respuesta en planta.

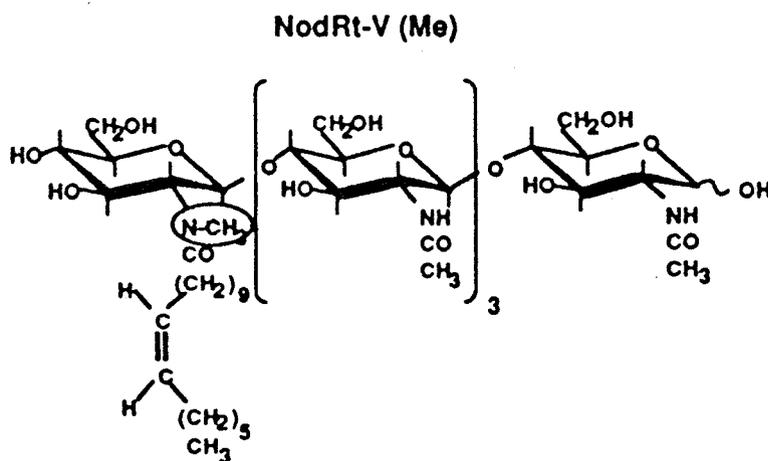
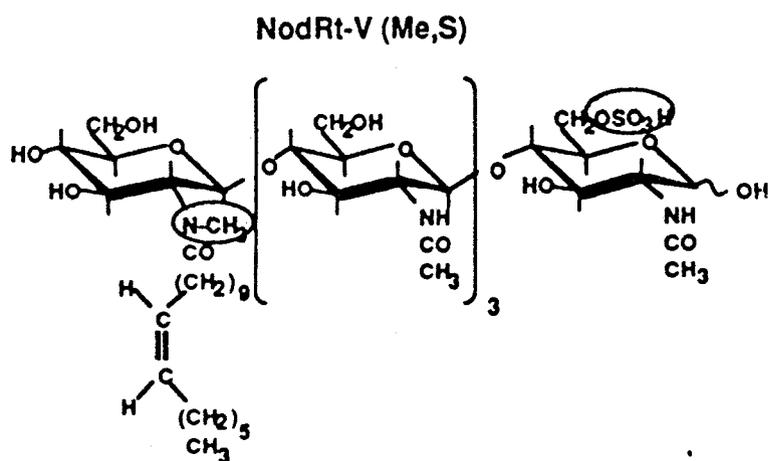
Figura 12.

A. Localización de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899, identificados en el cósmido pCV38 (Vargas y col., 1990)

B. Estructura de los factores NodRt-V(Me,S) y NodRt-V(Me), estudiados en *R. tropici* CIAT299 (Poupot y col., 1993).



B



En respuesta a los flavonoides excretados por la planta, *R. tropici* induce la excrección de IAA (ácido indol acético). Se observa que en la cepa curada del pSym no se produce esta inducción, y presenta disminuída su capacidad noduladora. Se piensa que este compuesto mantenga la actividad meristamática (Martínez y col., 1993).

En *P. vulgaris*, se han estudiado los exudados de semilla y de raíz, encontrándose que son compuestos distintos: antocianina y flavanoles, para semilla; y eridictiol, naringenina y genisteína, para raíz. También se observa que los exudados de raíz son menos cuantitativamente, pero son inductores más potentes que los de semilla (Hungría y col., 1991).

13.2. Polisacárido extracelular de *R. tropici* CIAT899

La estructura del polisacárido extracelular que secreta CIAT899 ha sido estudiada por análisis de metilación, espectroscopía H-n.m.r. e hidrólisis ácida parcial. Esta estructura consta de una unidad octosacarídica repetitiva formada por D-glucosa, D-galactosa, ácido pirúvico y ácido acético en proporciones 6: 2: 1,5: 1,5 (Figura 13)

La mitad de los grupos terminales de galactosa están 4,6-sustituidos por ácido pirúvico acetal, y la otra mitad por grupos O-acetil en posición 3. Además uno de los residuos de glucosa, unidos por enlaces 1,3, lleva un ácido pirúvico 4,6-acetal, mientras que una de las glucosas con unión 4, está acetilada en posición 6 (Gil-Serrano y col., 1990).

13.3. β -glucanos cíclicos en *R. tropici* CIAT899..

Coronado y col. (1989) han identificado en el cromosoma de CIAT899, los genes *ndvA* y *ndvB*, que intervienen en el transporte y síntesis de los β -glucanos. El número de copias encontrado, ha sido de una para *ndvA* y dos para *ndvB*.

La estructura y conformación del (1-2)- β -glucano cíclico producido por *R. tropici* CIAT899 ha sido recientemente estudiado por Gil-Serrano y col. (1993). En la Figura 14 se muestra la estructura encontrada.

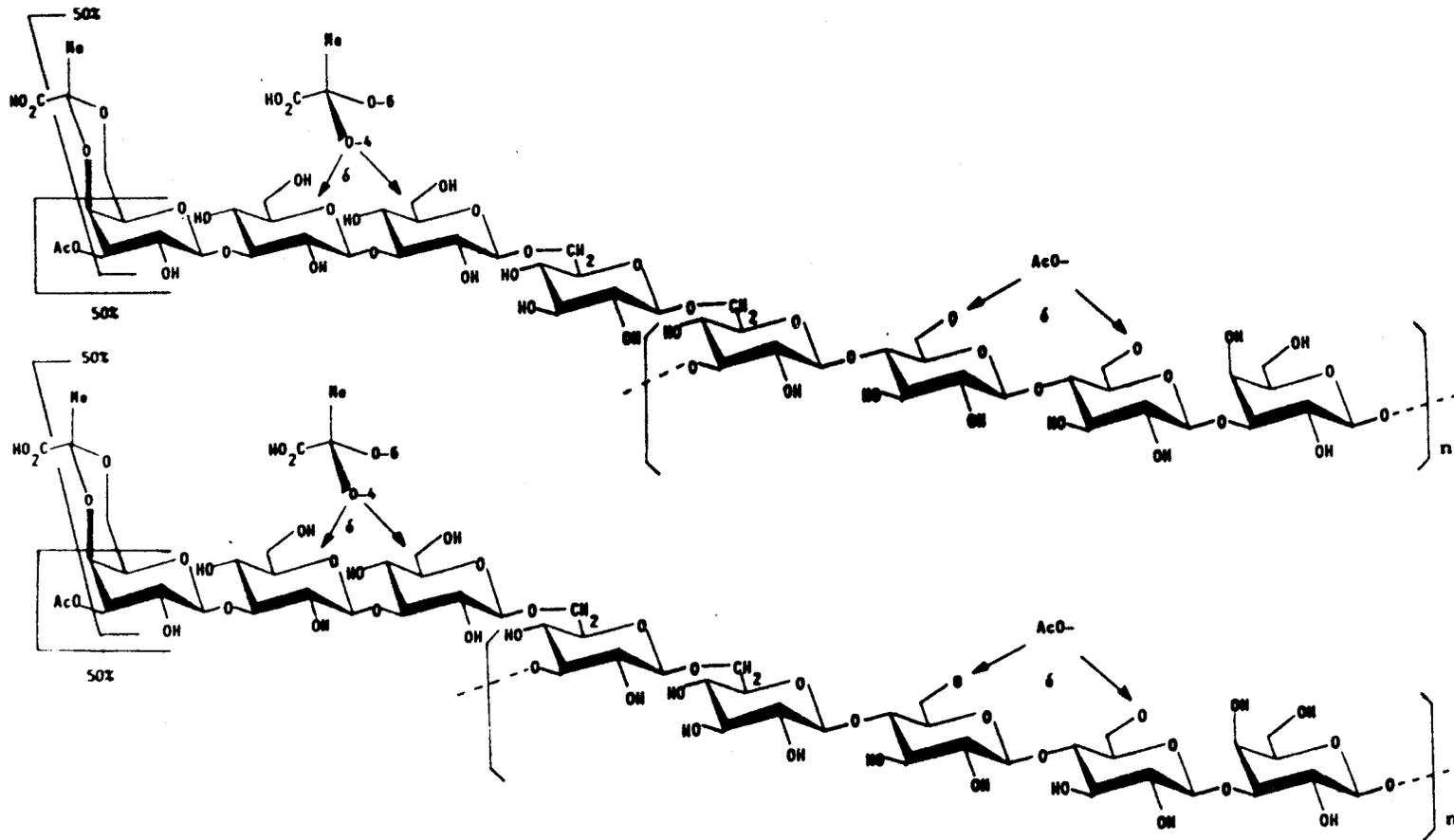


Figura 13.

Estructura del polisacárido extracelular secretado por *R. tropici* CIAT899 (Gil-Serrano y col., 1990).

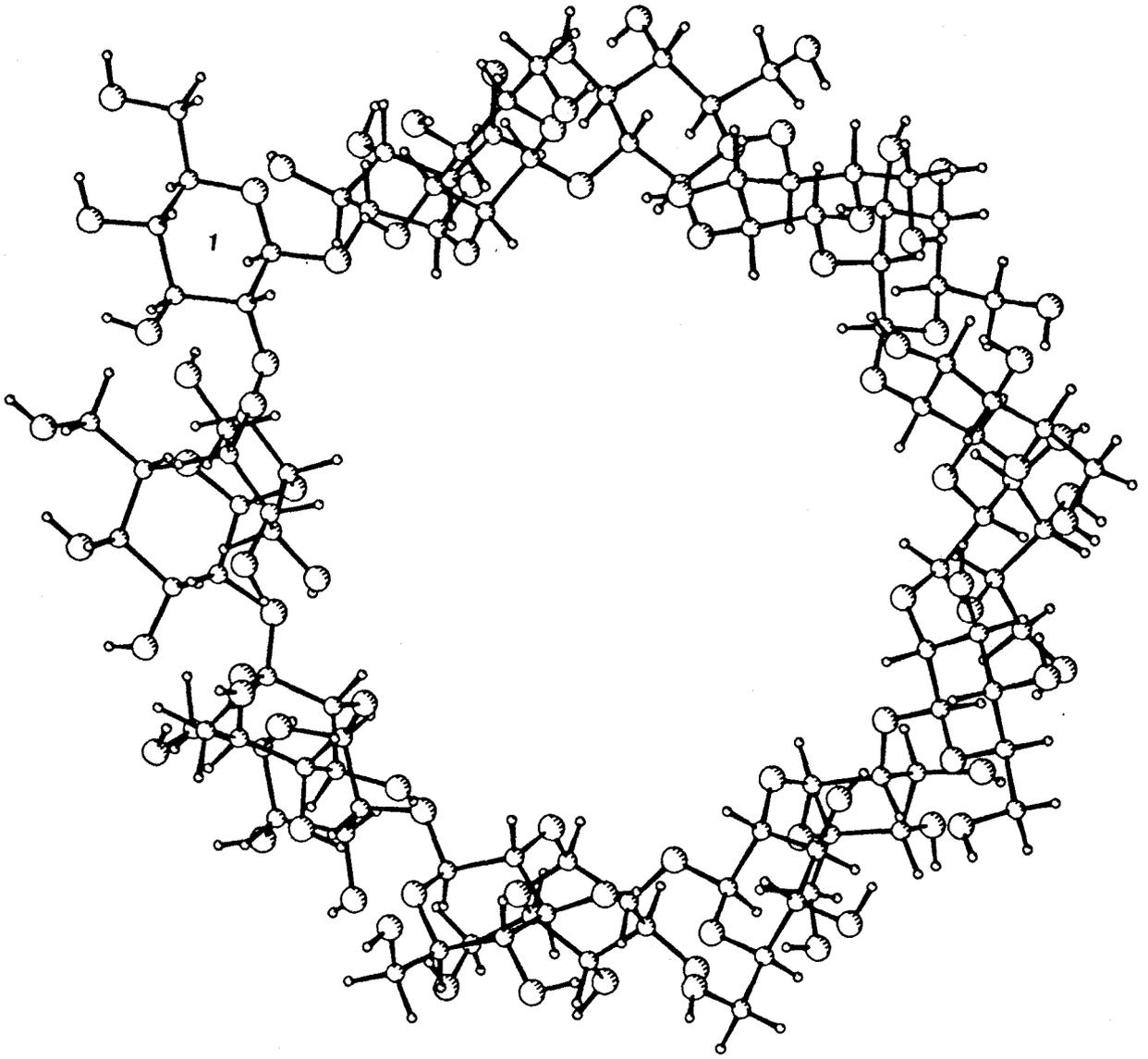


Figura 14.

Mecanismo molecular de la energía de conformación mínima para el glucano cíclico producido por *R. tropici* CIAT899 (Gil-Serrano y col., 1994).

13.4. Lipopolisacáridos en *R. tropici* CIAT899.

El estudio de los componentes lipídicos del lípidoA en *R. tropici*, indica la presencia de ácidos grasos 3-hidroxiados, ácido vaccénico, ácido lactobacílico, y ácidos grasos de larga cadena: 27- hidroxioctacosanoico y 29-hidroxitriacontanoico, que en la familia *Rhizobiaceae* presentan un carácter taxonómico (Gil-Serrano y col., 1994).

13.5. Otros estudios realizados en *R. tropici*.

Se han llevado a cabo estudios con mutantes afectados en la cantidad de EPS producido, menor con respecto a la cepa silvestre, y se observa aunque el mutante permanece Fix⁺, es menos competitivo.

Esta disminución de la producción de EPS en los mutantes va acompañada de la capacidad de formar nódulos fijadores en siratro, mientras que la silvestre induce nódulos inefectivos (Milner y col., 1992).

A partir de la clorosis en hojas de frijol observada tras la inoculación con mutantes al EPS de CIAT899, se ha comprobado que se trata de una peculiaridad de esta cepa, no así de CIAT299, ni de otro tipo de bacterias. CIAT899 es capaz de inducir clorosis en hojas de sus leguminosas hospedadoras, no hospedadoras, así como de algunas dicotiledóneas (girasol, tomate, calabaza) (O`Connell y Handelsman, 1993). Un efecto similar se ha observado en *B. japonicum*, pero limitado a sus hospedadores simbióticos (Owens y Wright, 1965).

Para observar este efecto es necesario que haya un contacto entre la bacteria y la célula vegetal, y que existan ciertas fuentes de carbono, por lo que se piensa que el responsable sea un factor no excretado por los rizobios. La nodulación, sin embargo, parece no estar relacionada, ya que cepas curadas del plásmido simbiótico y no noduladoras no inducen la clorosis (O`Connell y Handelsman, 1993).

En cuanto a la función del EPS en CIAT899, es sabido que es el responsable de su tolerancia a medios ácidos (pH 5), pero a pesar de su capacidad para unir metales, no está relacionado con su tolerancia a altos

niveles de aluminio, así como tampoco se debe a una resistencia codificada por el plásmido simbiótico (Kingsley y Bohlool, 1992).

II. OBJETIVOS

Todo el proceso de la fijación biológica de nitrógeno, ha sido ya ampliamente estudiado y en este estudio de la relación simbiótica que se establece entre los rizobios y leguminosas, ha sido de gran importancia el aislamiento de mutantes que mostraban un fenotipo simbiótico defectivo.

El análisis de estas mutaciones ha llevado al conocimiento de los genes que intervienen en las distintas etapas del proceso (*nod*, *fix*, *nif*), así como de las posibles interacciones bioquímicas que tienen lugar entre las estructuras de superficie de la bacteria (EPS, LPS y β -glucanos) y la planta, las características fisiológicas de las estructuras que se inducen o nódulos, los genes de la planta que se inducen en el proceso, etc.

En nuestro laboratorio está siendo estudiada la cepa de *R. tropici* CIAT899 (Vargas y col., 1990. Sousa y col., 1993. M.J. Romero. T. Licenciatura), por lo que contábamos con un adecuado material biológico, para los objetivos que en este trabajo se han querido llevar a cabo.

Decidimos como **primer objetivo**, el aislamiento de genes de *R. tropici* CIAT899, responsables de la regulación o síntesis de las estructuras superficiales de la bacteria, ya que parecen jugar un importante papel en el proceso simbiótico.

En un **segundo lugar** y ya que contábamos con una colección de mutantes de CIAT899 obtenidos en nuestro laboratorio (M.J. Romero) que asociado a una alteración en la producción de EPS, mostraban procesos simbióticos defectivos, se intentó la caracterización genética de las mutaciones implicadas.

III. MATERIALES Y METODOS

1. BACTERIAS Y PLASMIDOS.

En la Tabla 2 se muestran las cepas bacterianas y los plásmidos (o cósmidos) que se han utilizado en el presente estudio.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Las estirpes de *Rhizobium* se cultivaron a 28°C en medio rico TY (Beringer, 1974) o en medios mínimos M9 . Las cepas de *E.coli* se cultivaron en medio LB a 27°C (Maniatis y col., 1982).

La composición del medio TY fue la siguiente:

Triptona	5,00 g
Extracto de levadura	3,00 g
CaCl ₂ . 6H ₂ O	0,84 g
H ₂ O dest.	1 l

La composición del medio M9 fue la siguiente:

Na ₂ HPO ₄	6,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	1,0 g
Manitol	10 g
H ₂ O dest.	1 l

La composición del medio LB es la siguiente:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O dest.	1 l

3. ANTIMICROBIANOS Y PRODUCTOS QUIMICOS AÑADIDOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Los antimicrobianos: ampicilina, estreptomina, espectinomina, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico y neomicina se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membrana (de nitrato de

Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en este estudio

Cepa bacteriana o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
I.- Cepas bacterianas		
<i>Rhizobium tropici</i>		
CIAT899	silvestre, Rf ^R , Cm ^R , Ap ^R	Martínez y col. (1985)
RSP900	derivada de CIAT899 curada del pSym, Rf ^R , Cm ^R , Ap ^R	M. Megías
RSP1MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP4MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP9MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP10MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP21MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP25M	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP29MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP30MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP35MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R	M.J. Romero
RSP36MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R .	M.J. Romero
RSP44MJ	derivada de CIAT899, Tn5- <i>mob</i> Rf ^R , Km ^R .	M.J. Romero

Rhizobium meliloti

102F34	cepa silvestre, N1 ^R	Ditta y col., (1980)
LI1	mutante <i>ndvA</i> de la cepa silvestre 102F34	Stanfield y col., (1988)
Ty7	mutante <i>ndvB</i> de la cepa silvestre 102F34	Dylan y col., (1986)
Rm1021	derivada Sm ^R de la cepa silvestre SU47	F. Ausubel
Rm7031	Rm1021 <i>exoA::Tn5</i>	Long y col., (1988)
Rm7094	Rm1021 <i>exoB::Tn5</i>	Long y col., (1988)
Rm7015	Rm1021 <i>exoC::Tn5</i>	Long y col., (1998)
Rm7033	Rm1021 <i>exoF::Tn5</i>	Long y col., (1998)

R. l. bv. phaseoli

CFN037	derivada Tn5- <i>mob</i> de la cepa CE3 St ^R	Soberón y col., (1990)
--------	---	------------------------

Escherichia coli

HB101	F ⁻ , <i>hsdS</i> , <i>hsdM</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>gal</i> , <i>lacY</i> , <i>recA</i> , Str ^R	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
DH5 α	<i>supE44</i> , <i>lacU169</i> , (ϕ 80, <i>lacZ</i> , M15) <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, (1933)

II.- Plásmidos

pVK102	cósmido derivado de pRK290, Km ^R , Tc ^R	Knauf y Nester (1982)
pRK2013	plásmido cooperador Nm ^R	Figurski y Helinski (1979)
pSUP5011	plásmido portador de Tn5- <i>mob</i> Nm ^R , Km ^R	R. Simon (1983)
pRK404	plásmido derivado de pRK290, Lac, Tc ^R	Ditta y col. (1985)
pCV38	inserto de 28,8 kb del pSym de	Vargas y col. (1990)

	CIAT899 clonado en el sitio <i>Hind</i> III de pVK102	
pSAB104.78	plásmido portador de los genes <i>exoXYFQ</i> de <i>R. meliloti</i> 2011	Becker y col., (1993)
pD34	cósmido derivado de pLAFR1, portador del gen <i>exoA</i> de <i>R. meliloti</i>	J.A. Leigh (1985)
pD2	cósmido derivado de pLAFR1 portador del gen <i>exoB</i> de <i>R. meliloti</i>	J.A. Leigh (1985)
pD15	cósmido derivado de pLAFR1 portador del gen <i>exoC</i> de <i>R. meliloti</i>	J.A. Leigh (1985)
pBluescript (SK ⁺)	plásmidos derivados de pUC19 contienen un origen de replicación de f1 y un promotor de T7, Ap ^R	Short y col. (1989) Stratagene
M13mp18	bacteriófago derivado de M13	Norlander y col., (1983)
serie pMTs (L01, L02, L03)	cósmidos derivados de pVK102 portadores de regiones de CIAT899 que complementan a LI1.	Este trabajo
serie pMTs (701, 702, 703 y 704)	cósmidos derivados de pVK102 portadores de regiones de CIAT899 que complementan a Ty7.	Este trabajo
pMTA01	cósmidos derivados de pVK102 portadores de regiones de CIAT899 que complementan a Rm7031.	Este trabajo
pMTB (01, 02 y 03)	cósmidos derivados de pVK102 portadores de regiones de CIAT899 que complementan a Rm7094.	Este trabajo
pMTC (01, 02, 03 y 04)	cósmidos derivados de pVK102 portadores de regiones de CIAT899 que complementan a Rm7015.	Este trabajo
Series pMTs (1, 9, 10, 21, 25, 30, 35, 36 y 44)	cósmidos derivados de pVK102, portador de fragmentos <i>Hind</i> III aislados por complementación de las cepas RSP.	Este trabajo

pMT902	fragmento <i>Bam</i> HI de 6,2 Kb de pMT9 subclonadas en pRK404	Este trabajo
pMT903	fragmento <i>Bam</i> HI de 3,0 Kb de pMT9 subclonadas en pRK404	Este trabajo
pMT904	fragmento <i>Bam</i> HI de 1,25 Kb de pMT9 subclonadas en pRK404	Este trabajo
pMT905	fragmento <i>Bam</i> HI de 1,05 Kb de pMT9 subclonadas en pRK404	Este trabajo
pMT101	religación del fragmento BamHI derivado de pMT1, que contiene a pVK102.	Este trabajo
pMT102	fragmento <i>Bam</i> HI de 7,3 Kb de pMT1 subclonado en pRK404	Este trabajo
pMT103	fragmento <i>Bam</i> HI de 1,5 Kb de pMT1 subclonado en pRK404	Este trabajo
pMT525	fragmento <i>Eco</i> RI portador de Tn5- <i>mob</i> de la cepa RSP25MJ clonado en pBluescript pSK ⁺	Este trabajo
pMT536	fragmento <i>Eco</i> RI portador de Tn5- <i>mob</i> de la cepa RSP36MJ clonado en pBluescript pSK ⁺	Este trabajo
pMT509	fragmento <i>Eco</i> RI portador de Tn5- <i>mob</i> de la cepa RSP9MJ clonado en pBluescript pSK ⁺	Este trabajo
pMT2102	cósmido derivado de pVK102 portador de los genes <i>ilvDA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899	Este trabajo

celulosa) de 0,45 μm de diámetro de poro; la rifampicina se disolvió en metanol, y la tetraciclina en una mezcla a partes iguales de etanol/agua destilada. Todas estas soluciones se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización, añadiéndose a los medios a las concentraciones finales abajo indicadas:

Ampicilina	100 $\mu\text{g/ml}$
Espectinomicina	80 $\mu\text{g/ml}$
Estreptomycin	500 $\mu\text{g/ml}$ (<i>Rhizobium</i>)
		100 $\mu\text{g/ml}$ (<i>E. coli</i>)
Gentamicina	35 $\mu\text{g/ml}$
Kanamicina	50 $\mu\text{g/ml}$
Acido nalidíxico	10 $\mu\text{g/ml}$
Neomicina	50 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicina	50 $\mu\text{g/ml}$
Tetraciclina	15 $\mu\text{g/ml}$ (<i>E. coli</i>)
		5 $\mu\text{g/ml}$ (<i>Rhizobium</i>)

El producto 1,5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosidasa (X-gal)(Boehringer-Mannheim) se conservó al 2% en dimetil-formamida a -20°C y se añadió a los medios a una concentración final de 40 $\mu\text{g/ml}$. El inductor Isopropil- β -D-tiogalactopiranososa (IPTG) (Boehringer-Mannheim) se disolvió al 2,5% en agua bidestilada estéril y se conservó a -20°C añadiéndose a los medios de cultivo a una concentración final de 25 $\mu\text{g/ml}$.

Fluorescent Brightener 28 (calcofluor) se adquirió de Sigma Chemical Company, y se añadió al medio a una concentración final de 0,02%.

Los aminoácidos L-leucina, L-valina, L-isoleucina y ácido pantoténico, fueron proporcionados por Sigma Chemical Company. Se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membrana de nitrato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro. Las soluciones se conservaron a 4°C y se añadieron al medio a las concentraciones finales de: 50 mg/l los aminoácidos, y 8,4 mg/l las vitaminas.

4. ENZIMAS, ISOTOPOS Y KIT.

Las endonucleasas de restricción, la enzima T4 ligasa y la fosfatasa alcalina de intestino de ternera, se adquirieron en Boehringer-Mannheim; los reactivos de secuenciación y el kit "Sequenase version 2.0" se adquirieron a United States Biochemicals Corp., y se utilizaron según las instrucciones de los suministradores.

El isótopo radioactivo α - ^{32}P -dCTP se adquirió a Amersham Int. en forma de solución acuosa. Los fragmentos de ADN que iban a ser usados como sondas radioactivas se marcaron mediante el sistema "multiprime" utilizando para ello el kit "Multiprime DNA labeling system" (Amersham Int.), siguiendo las instrucciones y recomendaciones de la casa suministradora.

Para la obtención de fragmentos purificados de ADN se utilizaron los kits "Genaclean^R I y Geneclean^R II (Bio 101) siguiendo las instrucciones de los suministradores.

Para el marcaje de sondas de ADN mediante el método no radiactivo, se utilizó el kit "DNA labeling and detection kit nonradioactive" (Boehringer-Mannheim) siguiendo las instrucciones de los suministradores.

5. SOLUCIONES NUTRITIVAS PARA PLANTAS.

Para los ensayos en plantas de alfalfa se utilizó la siguiente solución nutritiva:

Soluciones stock:

A.- 250X de KCl/KH₂PO₄

KCl	125 g
KH ₂ PO ₄	50 g
H ₂ O dest.c.s.p.	1 l

B.- 500X de MgSO₄

MgSO ₄	100 g
H ₂ O dest.c.s.p.	1 l

C.- 200X de Oligoelementos

H ₃ BO ₃ (sol. 1% p/v)	20 ml
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O (sol. 1% p/v)	20 ml

CuSO ₄ . 5 H ₂ O (sol. 1% p/v)	10 ml
MnCl ₂ . 4H ₂ O (sol. 1% p/v)	2 ml
H ₂ O dest.c.s.p.	1 l

D.- 5000X de FeEDTA

FeEDTA	46,4 g
H ₂ O dest.c.s.p.	1 l

La solución se esteriliza por filtración con membrana (de nitrato de celulosa) de 0,45 µm de diámetro de poro.

Para obtener 1 litro de solución nutritiva se toman las siguientes cantidades de las soluciones stock:

250X de KCl/KH ₂ PO ₄	4 ml
500X de MgSO ₄	2 ml
200X de Oligoelementos	5 ml
CaSO ₄	0,2 g

Se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión y cuando está frío se le añaden 0,2 ml de la solución 5000X de FeEDTA.

Solución nutritiva usada para el ensayo en plantas de **frijol**.

Soluciones stock:

A.- Medio Australiano:

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ . H ₂ O	4,06 g
ZnSO ₄ . H ₂ O	0,44 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,15 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ . 4H ₂ O	0,02 g
H ₂ O dest.c.s.p.	1 l

B.- Solución de FeEDTA

FeEDTA	3,45 g
H ₂ O dest.c.s.p.	1 l

La solución se esteriliza por filtración.

C.- Solución de CaCl₂

CaCl ₂ . 6H ₂ O	10 g
H ₂ O dest.	1 l

Para la preparación de 1 litro de solución nutritiva se toman las siguientes cantidades de las soluciones stock:

Medio Australiano	0,3 ml
CaCl ₂	5,0 ml
KH ₂ PO ₄	0,10 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,10 g

KCl	0,10 g
H ₂ O dest.c.s.p.	1 l

Se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión y cuando está frío se le añaden 0,25 ml de FeEDTA.

6. ANALISIS DE PERFIL DE PLASMIDO.

Se analizó por electroforesis horizontal en gel de agarosa, utilizando la técnica de lisis directa en pocillo, descrita por Rodriguez-Quñones y col. (1989), basada en la originalmente descrita por Eckhart (1978) y modificada por Rosenberg y col. (1982).

7. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

El ADN purificado, total o digerido, se analizó en geles horizontales de agarosa, sumergidos en tampón TBB (Tris-base 89 mM; Na₂EDTA 2,5 mM; H₃BO₃ 89 mM; pH 8,2) y preparados, por lo general, al 1% en el mismo tampón, tal como indican Maniatis y col. (1982). El ADN se visualizó por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml en agua destilada), durante una hora, los geles se destiñeron durante 20 minutos en agua destilada y se observaron en transiluminador, con luz ultravioleta a 300 nm, fotografiándose con película Kodak Tri-X Pan 400 ASA y filtro Kodak Wratten N° 23 A.

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon según la curva lg peso molecular-movilidad, obtenida en función de las distancias de migración de los fragmentos *Hind*III o *Pst*I del estándar Lambda cI857Sam7 (Boehringer-Mannheim).

Para el cálculo de pesos moleculares de fragmentos de ADN de tamaño elevado, se usaron geles de agarosa de baja concentración (0,6%), mantenidos a 20-40 voltios entre 12-20 horas.

Para la realización de mapas físicos de restricción se utilizaron distintas concentraciones de agarosa (0,5%, 1% y 1,5%). La agarosa empleada fue Sea Kem Me de FMC.

8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA: GELES DE SECUENCIACION.

Las muestras procedentes de las reacciones de secuenciación, se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Se utilizaron geles de 33 x 41,2 cm (anchura por altura) con gradiente de espesor comprendido entre 0,25 mm (parte superior) a 0,6 mm (parte inferior). La composición final de los geles fue de 7,6% acrilamida, 0,4% N, N´metilén bisacrilamida, 8 M urea, 0,036% persulfato amónico, 1µl/ml TEMED en TBB (Maniatis y col., 1982). El stock de acrilamida-N, N´metilén bisacrilamida (38%-2%) se preparó en agua destilada, se filtró en vacío en papel Whatman nº1 de 0,45 µm de poro y se conservó a 4°C en botellas oscuras.

De cada muestra de reacción de secuencia, previamente calentada 3 minutos a 100°C, se introdujeron 2,5 µl en el gel, y los polinucleótidos se resolvieron por electroforesis a una intensidad constante de 38 mA, usando tampón TBB. Una vez terminada la electroforesis, los geles se fijaron durante 1 h a 80°C en vacío sobre una hoja de papel Whatman 3MM. Finalmente, los polinucleótidos se identificaron en el gel por exposición de una película autorradiográfica Kodak, X-Omat AR, durante 16-24 h.

9. RECUPERACION DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles de agarosa siguiendo dos técnicas:

- 1) electroelución (Maniatis y col.,1982), seguida de purificación con fenol/cloroformo y precipitación con etanol del 96%.
- 2) por utilización de los kits "Geneclean^R I" y "Geneclean^R II".

10. EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN

10.1. ADN TOTAL.

El ADN genómico total de las especies de *Rhizobium* se obtuvo por lisis con SDS/pronasa (Sigma), seguida de sucesivas purificaciones con

fenol, fenol/cloroformo y cloroformo, precipitación con etanol del 96% y lavado con etanol del 70%, tal y como describe Maniatis y col.(1982).

10.2. ADN PLASMIDICO.

10.2.1. Aislamiento de plásmidos de *E. coli*.

Los plásmidos o cósmidos, tanto a gran escala como en minipreparaciones (a partir de 1 litro o de 1 ml de cultivo respectivamente), se aislaron por el método de lisis alcalina descrito por Maniatis y col. (1982).

En los aislamientos a gran escala, el ADN se purificó adicionalmente por centrifugación en gradiente de CsCl-bromuro de etidio, utilizándose por cada litro de muestra un gradiente de 34 ml, que se centrifugó en un rotor vertical Sorvall TV 850 durante 20 horas, a 39.000 rpm y 18°C.

Cuando se precisó una mayor purificación, el ADN obtenido en la primera ultracentrifugación se recuperó del gradiente y se cargó directamente en otro gradiente de 4,5 ml, que se centrifugó a 39,000 rpm durante 48 horas en un rotor basculante Sorvall AH650.

Tras la última centrifugación, el bromuro de etidio se extrajo con alcohol isoamílico y el CsCl se eliminó por diálisis prolongada frente a Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y Na₂EDTA 1 mM. Cuando fue requerido el ADN se concentró por precipitación con etanol.

10.2.2. Aislamiento de plásmidos de *Rhizobium*, de bajo peso molecular.

Los plásmidos y cósmidos contenidos en *Rhizobium* se aislaron por una modificación del método Ish-Horowics y Burke. Las células de 5 ml de cultivo en fase estacionaria temprana se recogieron y lavaron con 150 µl de TEN (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; Na₂EDTA 1 mM; NaCl 100 mM) conteniendo 0,1% de sarcosil (Sigma). Después de la centrifugación, las células se resuspendieron en 160 µl de solución I (Tris-Cl 10 mM pH 8,0; Na₂EDTA 1 mM; glucosa 50 mM pH 8,0) y se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a continuación 200 µl de solución II (NaOH 0,2 N; SDS 1%) recién preparada y una vez pasados 10 minutos en

hielo, se adicionaron 250 μ l de solución III (acetato potásico 5 M pH 4,8), dejando la reacción otros diez minutos en hielo. Una vez centrifugado, el sobrenadante se fenolizó y el ADN se precipitó con etanol de 96% y se lavó con etanol de 70%.

10.3. ADN MONOCATENARIO.

Se siguió la técnica descrita en el manual de Bluescript de Stratagene Cloning System y en Sambrook y col. (1989). Se utilizó *E. coli* CMK como cepa hospedadora de los plásmidos derivados de pBluescript, y del bacteriófago colaborador M13mp18.

11. MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS SONDAS DE ADN.

Por lo general, y para una reacción estándar de 50 μ l de volumen final, se marcaron 0,5-1 μ g de ADN utilizando 50 μ Ci de α -³²P-dCTP mediante el kit "Multiprime DNA labeling system". En todos los casos, se consiguieron actividades entre 1×10^8 y 1×10^9 cpm/ μ g de ADN.

Una vez finalizado el tiempo de la reacción de marcaje, dicha reacción se paró por adición de 30 μ l de tampón de terminación (16 μ l de EDTA 100 mM; 2,5 μ l de SDS al 20%; 0,5 μ l de ADN de esperma de salmón 20 mg/ml y 11 μ l de agua bidestilada). La eliminación de los nucleótidos no incorporados se llevó a cabo mediante precipitación de la sonda radiactiva con etanol de 96% (-20°C), se centrifugó y la sonda se disolvió en agua bidestilada y se desnaturalizó por adición de 1/10 de volumen de NaOH 3 N.

12. HIBRIDACIONES DE ADN.

Las hibridaciones de ADN se realizaron de acuerdo con la técnica descrita por Kondorosi y col. (1982) con mínimas modificaciones.

12.1. PREPARACION DE LAS MEMBRANAS.

Los geles de agarosa se desnaturalizaron con NaOH y se neutralizaron con Tris-CIH pH 8,0 como se describe en el manual de Maniatis y col. (1982). El ADN de los geles se transfirió a membranas de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Int., 0,45 μ m de diámetro de poro) por capilaridad,

siguiendo la técnica de Southern (1975) y utilizando SSC 20X como solución de transferencia (SSC 1X: NaCl 0,15 M; citrato sódico, 0,015 M; pH 7,0).

Una vez efectuada la transferencia de membranas, se lavaron en SSC 2X y se secaron durante 2 horas a 80°C (para lograr la fijación del ADN a la membrana).

12.2. PREHIBRIDACION

Las membranas se prehibridación durante 12 horas a 42°C en tubos de vidrio que contenían aproximadamente 15 ml de tampón de hibridación SSC 3X, 30% de formamida desionizada, SDS al 1%; Na₂HPO₄ 25 mM; NaH₂PO₄ 25mM; 0,02% de BSA, PVP y Ficoll 400 (Pharmacia) y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón (Sigma) previamente desnaturalizado con NaOH, desproteínizado con proteinasa K (Boehringer Mannheim) y fenolizado.

12.3. HIBRIDACION.

La hibridación se llevó a cabo durante 24 horas en las mismas condiciones que la prehibridación, pero añadiendo a la solución anterior la sonda radioactiva (10⁸-10⁹ cpm/µg de ADN), previamente desnaturalizada por la adición de 1/10 de volumen de NaOH 3 N.

12.4. LAVADO DE LAS MEMBRANAS.

Tras la hibridación, las membranas se lavaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente a 55°C durante 30 minutos y por último 30 minutos a temperatura ambiente, en todos los casos con una solución que contenía SDS al 0,1% y SSC 2X.

12.5. EXPOSICION DE LAS MEMBRANAS.

Una vez secas, las membranas se expusieron sobre película Kodak X-Omat R, con pantalla amplificadora a -70°C durante varios días, al cabo de los cuales se procedió al revelado de las películas utilizando soluciones de revelador y fijador igualmente suministradas por Kodak.

13. TECNICAS DE TRANSFERENCIA DE ADN.

13.1. CONJUGACION.

13.1.1. Conjugación en filtro.

La conjugación triparental se realizó según la técnica descrita por Ditta y col. (1980). Se mezclaron en la proporción 1:1:0,5 (células donadoras, células receptoras y células cooperadoras) cultivos en fase estacionaria temprana y se filtraron por membrana (de nitrato de celulosa) de 0,45 μm de diámetro de poro y se depositaron sobre placas de Petri con medio TY. Tras 18 horas de incubación a 30°C, la masa bacteriana se recogió en 5 ml de solución salina estéril al 0,85%, una vez realizadas las diluciones oportunas se sembró en los medios selectivos adecuados.

13.1.2. Conjugación en placa.

Se realizó directamente en placa TY mezclando un asa de cultivos frescos en medio rico sólido de células donadoras, receptoras y cooperadoras. La mezcla se incubó en las mismas condiciones descritas en al método anterior y los transconjugantes se seleccionaron extendiendo la masa de conjugación directamente sobre placas de medio selectivo hasta la obtención de células aisladas.

13.2. TRANSFORMACION.

Las células de *E. coli* se hicieron competentes mediante tratamiento con CaCl_2 en frío. Se tomaron 50 ml de un cultivo de *E. coli* HB101, CMK o DH5 α y se incubaron a 37°C con agitación hasta que la D.O.600 nm estuvo comprendida entre 0,4 y 0,6. Las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos. Los cultivos se resuspendieron en 25 ml de CaCl_2 , 100 mM, previamente enfriados en hielo. Después de mantenerlas 10 minutos en hielo, las células se sedimentaron y resuspendieron de nuevo en 5 ml de la misma solución de cloruro cálcico.

Para la transformación se añadieron entre 0,4 y 0,6 μg de ADN por cada 100 μl de células competentes , y se mantuvo en hielo durante 30 minutos, exponiéndola luego a un choque térmico de 42°C durante dos minutos y medio. Posteriormente se añadió 1 ml de LB estéril sin

antibiótico y se incubó de 30 a 60 minutos a 37°C para permitir la expresión de los marcadores. Finalmente, las células se concentraron por centrifugación, se resuspendieron en 200 µl de LB estéril, y se sembraron en los medios adecuados para seleccionar los transformantes.

14. SECUENCIACION.

14.1. ESTRATEGIA DE LA SECUENCIACION.

La secuenciación se realizó mediante subclonación en pBluescript SK⁺, y en el bacteriófago M13mp18, para la obtención de ADN de cadena sencilla. El análisis de secuencia de nucleótidos y aminoácidos se realizó mediante los programas: GCG Sequence Analysis Software Package (Genetics Computer Group, Biotechnology Center, University of Wisconsin, Madison, USA) y DNA Strider (C. Marck, Dept. Biologie, Centre d'Etudes Nucleaires de Saclay, 9119 Gif-sur-Yvette, Francia).

14.2. METODO DE SECUENCIACION.

La secuenciación de ADN se realizó según el método enzimático de los dideoxinucleótidos (Sanger y col., 1977) adaptado para el uso de DNA polimerasa del bacteriófago T7 ("Sequenase Version 2.0") (Tabor y Richardson, 1987). Como nucleótido marcado se utilizó ³⁵S-dATPαS (actividad específica mayor de 1.000 Ci/mmol). Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando el kit "Sequenase version 2.0" (United States Biochemical Corp.) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Como cebadores se utilizaron oligonucleótidos sintéticos para secuenciación obtenidos de Boehringer Mannheim (Forward M13 primer y Reverse M13 primer) y oligonucleótidos de apoyo sintetizados por la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México.

Para la secuenciación de ADN de doble cadena se partió de ADN plasmídico obtenido por gradiente de cloruro de cesio (punto 10.2.1 de Materiales y Métodos). 3 µg de este ADN fueron desnaturalizados a temperatura ambiente durante 10 min. en 20 µl de NaOH 0,2 N y EDTA 2 mM. El ADN desnaturalizado se precipitó con 2 µl de acetato sódico 3 M pH 4,5 y 70 µl de etanol frío durante 15 min. a -40°C, se recuperó por centrifugación (10 min a 4°C en microfuga) y se suspendió en 6 µl de H₂O

destilada. El anillamiento con 5 ng de cebador y la polimerización se realizaron según el protocolo estándar de secuenciación.

15. ENSAYOS DE NODULACION.

Para los ensayos de nodulación de alfalfa se utilizaron semillas de *Medicago sativa* cv. Aragón, que fueron esterilizadas superficialmente mediante el tratamiento con etanol de 96% durante 30 segundos y a continuación con HgCl₂ al 1% en etanol al 10% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril (Vincent, 1974; Kondorosi y col., 1977).

Para los estudios de nodulación de frijol se emplearon plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro jamapa. Las semillas fueron proporcionadas por el departamento de Biología Molecular de Plantas (Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México). Las semillas de frijol se esterilizaron superficialmente mediante el tratamiento con etanol del 96% durante 3 minutos y lejía comercial diluída al 20% durante 15 minutos, tras lo cual se enjuagaron abundantemente con agua destilada estéril.

Las semillas se dejaron germinar en placas de agar-agua (9g de agar/l de H₂O destilada) durante el tiempo necesario, según el tipo de semilla.

Una vez germinadas, las semillas se colocaron en recipientes estériles que contenían vermiculita empapada en solución nutritiva de plantas, adecuada para cada tipo de semilla. En el caso de semillas de alfalfa se colocaron 5 semillas por frasco, y en el caso de frijol se colocaron 2 semillas por frasco. Las semillas germinadas se inocularon con 1 ml de una suspensión bacteriana que contenía aproximadamente 10⁸ células/ml. Cuando las plantas se elevaron un centímetro sobre la superficie, se cubrió la vermiculita con una capa de arena parafinada estéril. Los recipientes con las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de plantas a 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

El ensayo se dió por finalizado a las dos semanas, en el caso del frijol y para plantas de alfalfa a las 5 semanas después de la inoculación.

16. ENSAYOS DE EFECTIVIDAD.

La capacidad fijadora de nitrógeno se entiende como actividad nitrogenasa, que se midió de forma indirecta como la reducción de acetileno a etileno por parte de los nódulos de la raíz, utilizando para ello un cromatógrafo de gases, según la técnica descrita por Koch y Evans (1966).

Las medidas se llevaron a cabo utilizando raíces completas. Después de separar las raíces de la parte aérea, se colocaron en frascos de vidrio que se cerraron herméticamente con tapones de caucho. Se retiró del frasco un volumen de 1 ml de aire que se reemplazó por igual cantidad de acetileno. Los frascos se mantuvieron durante al menos, 45 minutos a temperatura ambiente.

La determinación de la producción de etileno se llevó a cabo por cromatografía de gases en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 equipado con un detector de ionización de llama, una columna Poropak R malla 80-100 de 150 cm de longitud y 0,32 cm de diámetro interior, a la temperatura de 90°C. Como gas portador se utilizó nitrógeno a un flujo de 20 ml/min. Rutinariamente las medidas se hicieron inyectando 1 ml de cada muestra problema. Los picos de acetileno y etileno obtenidos, fueron previamente identificados por comparación de los tiempos de retención con los de los correspondientes patrones.

17. REAISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE NODULOS.

Los nódulos obtenidos en plantas de alfalfa, se esterilizaron superficialmente con una solución al 0,1% de cloruro mercuríco durante 30 segundos y a continuación extensamente lavados con agua destilada estéril. En el caso de los nódulos de plantas de frijol, éstos se esterilizaron superficialmente con etanol de 96% durante 5 minutos y posteriormente se lavaron abundantemente con agua destilada estéril. En ambos casos los nódulos se colocaron en placas Petri estériles y se adicionaron unas gotas de solución salina. Posteriormente, los nódulos se trituraron con una varilla de vidrio previamente esterilizada. El líquido resultante, se tomó con asa de platino y se sembró en medio rico TY (Beringer,1974), las colonias resultantes se probaron en los medios selectivos apropiados.

18. ESTUDIOS DE MICROSCOPIA.

18.1. MICROSCOPIA ESTEREOSCOPICA.

Se seleccionaron nódulos formados por cada una de las cepas objeto de estudio, a las dos semanas para los nódulos formados en plantas de frijol y a las 4-5 semanas para los formados en plantas de alfalfa. Los nódulos se observaron en una lupa modelo PM 10ADS (Olympus Automatic Photomicrographic system). Las fotografías se realizaron con un aumento de 1X, 1.5X y a 100 ASA.

18.2. MICROSCOPIA SEMIFINA.

Una vez seleccionados los nódulos objetos de estudio, se fijaron a 4°C durante dos horas en una solución de glutaraldehído al 3% de cacodilato sódico 100 mM, pH 7,2-7,4. La solución de glutaraldehído se eliminó mediante dos lavados de 15 minutos y uno de dos horas a 4°C con el tampón cacodilato sódico 100 mM, pH 7,2 durante dos horas. Pasado este tiempo se lavaron tres veces con el mismo tampón para eliminar la solución fijadora.

Una vez fijados los nódulos se procedió a la deshidratación de los mismos mediante sucesivos pases por acetona, durante 15 minutos, en concentración gradualmente creciente (50%, 70%, 80%, 90% y 100%), finalmente se pasó dos veces por acetona al 100% durante 30 minutos. En el momento de la deshidratación con acetona al 70% se hizo un tratamiento con acetato de uranilo al 1% p/v en acetona al 70% durante dos horas. Antes de continuar la deshidratación se eliminaron los residuos de acetato de uranilo mediante lavados con acetona al 70%.

Para la inclusión se utilizó resina Spurr que se preparó mezclando 10 g de dióxido de vinil ciclohexano, 26 g de noirenil succínico anhidro, 7 g de epoxi-resina y 0,4 g de dimetilamino etanol. La inclusión de los nódulos, previamente deshidratados, se realizó manteniéndolos inicialmente en una mezcla 1:1 acetona-resina y a continuación durante doce horas en resina. Los nódulos se colocaron en recipientes adecuados y se les añadió resina pura recién preparada, posteriormente se colocaron en una estufa a 70°C durante 8 horas, tiempo preciso para la polimerización de la resina.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

1. LOCALIZACION DE COSMIDOS EN EL BANCO DE GENES DE *R. TROPICI* CIAT899 QUE COMPLEMENTAN MUTACIONES *exo Y ndv* *R. MELILOTI*..

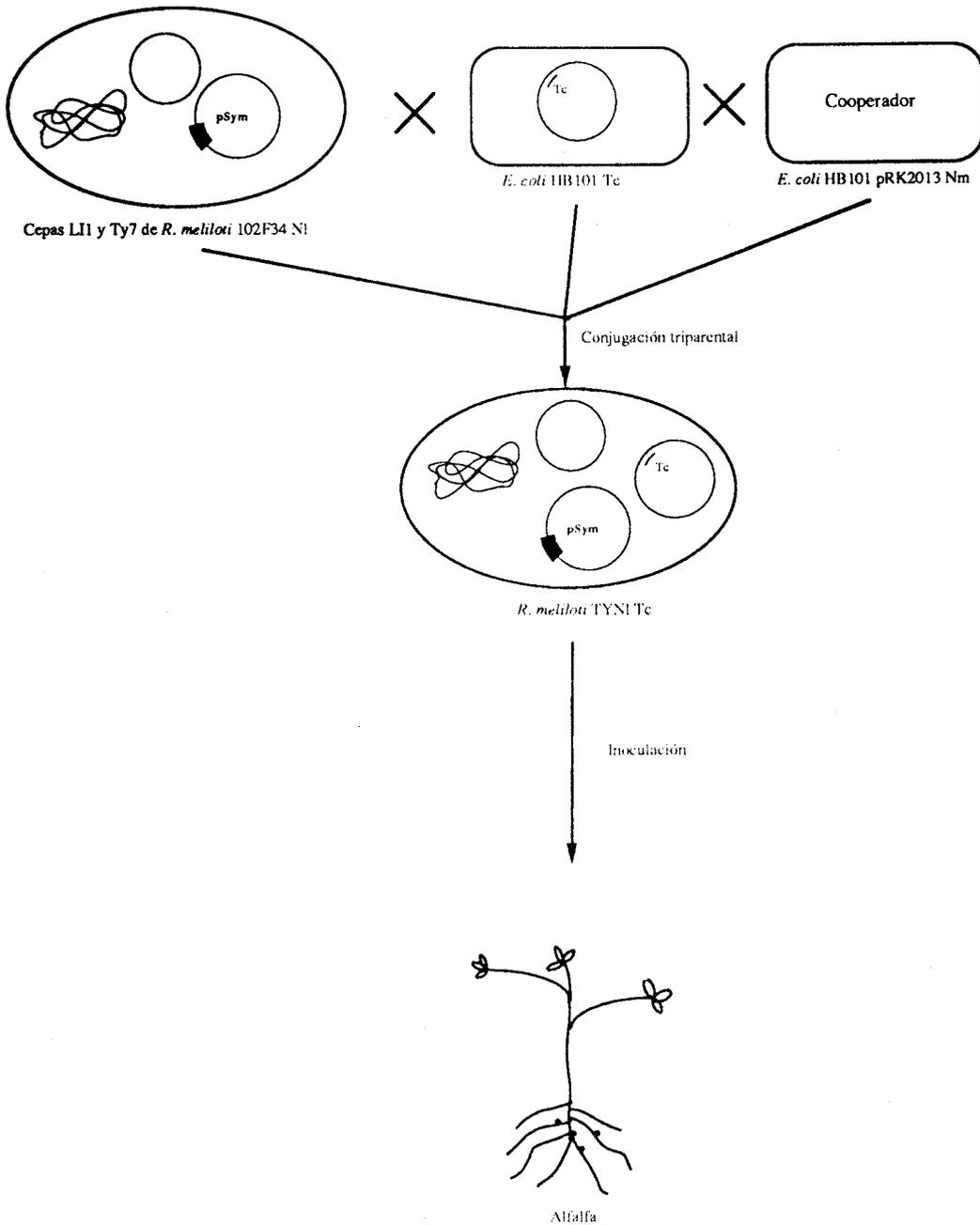
1.1. Complementación con el banco de genes de *R. tropici* CIAT899 de mutantes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti*.

1.1.1. Aislamiento de cósmidos que complementan a mutantes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti* mediante selección en planta.

Para poder aislar las regiones portadoras de los genes *ndvA* y *ndvB* en *R. tropici* CIAT899, se partió de los mutantes de *R. meliloti*, LI1 y Ty7 (ver Tabla 2, en Materiales y Métodos), afectados en estos genes, respectivamente. La complementación de estas mutaciones se realizó mediante conjugación triparental con el banco de genes de la cepa CIAT899, (construido en pVK102, vector de amplio rango de hospedador y bajo número de copias, y en el punto de restricción de *HindIII*) usando el plásmido cooperador pRK2013, (Figura 15). Los transconjugantes obtenidos fueron crecidos en medio TY adicionado de tetraciclina (resistencia del banco de genes) y ácido nalidíxico. En la complementación del mutante *ndvB*, se aislaron dos transconjugantes que al crecer en medios con los antibióticos apropiados, aparecían en forma de colonias muy mucosas.

Una vez obtenidos un número adecuado de transconjugantes portadores de cósmidos del banco de CIAT899, se procedió a inocularlos "en masa" en plantas de alfalfa. Como controles positivo y negativo del ensayo, plantas de alfalfa fueron simultáneamente inoculadas con la cepa silvestre Rm102F34 y con las cepas mutadas, LI1 y Ty7.

Al cabo de 31 días se procedió al aislamiento de bacterias a partir de nódulos que presentaban un fenotipo Nod⁺Fix⁺, en relación con los nódulos inducidos por los mutantes que permanecían no fijadores y de una coloración blanca (pseudonódulos).



- 1.- Aislamiento de bacterias de nódulos
- 2.- Comprobación de la resistencia que llevan los transconjugantes
- 3.- Obtención de ADN plasmídico
- 4.- Transformación en HB101

Figura 15.

Esquema de la técnica seguida para la obtención de transconjugantes portadores de cósmidos del banco de genes de CIAT899, que complementan las mutaciones *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti* 102F34.

Los nódulos inducidos por los transconjugantes de Ty7 que crecieron muy mucosos (cósmidos pMT701 y pMT702), no recuperaron la capacidad fijadora, presentaban nódulos similares a los inducidos por la cepa mutante Ty7.

Tras la esterilización de los nódulos seleccionados, el aislamiento de bacterias se hizo por crecimiento en medio TY con los antibióticos apropiados, tetraciclina y ácido nalidíxico.

1.1.2. Análisis de restricción de los cósmidos aislados.

Los cósmidos obtenidos a partir de las bacterias aisladas, se usaron para transformar *E. coli* HB101. Los transformantes se seleccionaron en medio LB adicionado de tetraciclina.

A partir de los transformantes de *E. coli*, se extrajeron de nuevo los ADN plasmídicos para su estudio mediante enzimas de restricción. En la Figura 16 se muestra el perfil de restricción de los cósmidos aislados, tras ser digeridos con la endonucleasa *Hind*III.

1.1.3. Caracterización del fenotipo simbiótico de los cósmidos aislados.

Para el mutante *ndvA* se seleccionaron tres tipos de cósmidos con perfiles de restricción diferentes (carril 1, carril 2 y carril 3 respectivamente), aunque presentan bandas comunes. Estos cósmidos pMT101, pMT102 y pMT103 indujeron nódulos fijadores.

Respecto al mutante *ndvB*, se seleccionaron cuatro tipos de cósmidos diferentes, los correspondientes a los carriles 1 (pMT701) y 3 (pMT702) que crecieron muy mucosos en medio de cultivo, y los correspondientes a los carriles 2 y 4 (pMT703 y pMT704, respectivamente). Los cósmidos pMT703 y pMT704 no comparten ningún fragmento de restricción, luego serán dos cósmidos que complementan a diferentes copias de los genes *ndvB* de *R. tropici*. Respecto a los cósmidos pMT701 y pMT702 son distintos entre sí e igualmente diferentes a los cósmidos pMT703 y pMT704, además no confieren una restauración del fenotipo simbiótico, lo que indica que no están complementando regiones homólogas a los genes *ndv*.

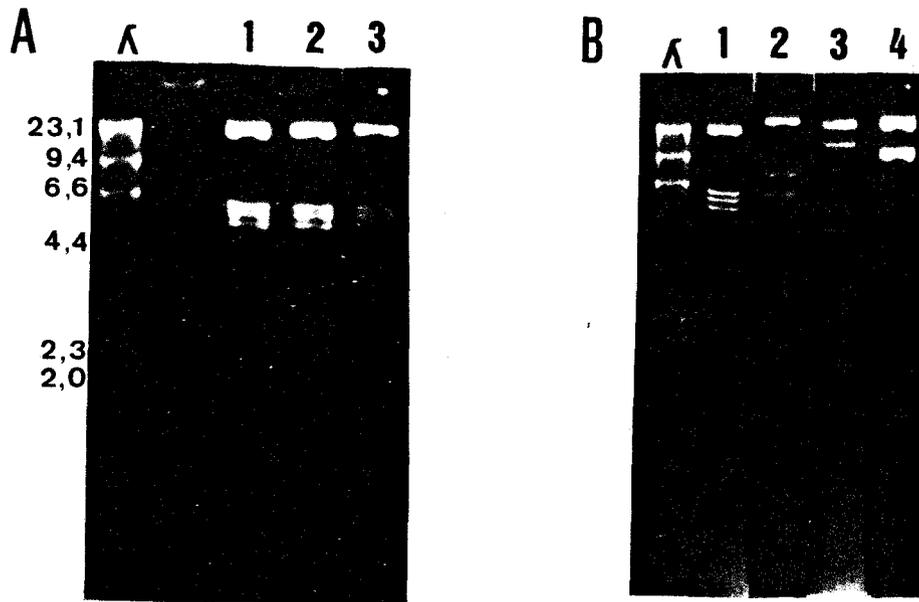


Figura 16.

Geles representativos de los cósmidos aislados, digeridos con la endonucleasa de restricción *Hind*III.

A. Cósmidos pMTL01 (carril 1), pMTL02 (carril 2) y pMTL03 (carril 3).

B. Cósmidos pMT701 (carril 1), pMT703 (carril 2), pMT702 (carril 3) y pMT704 (carril 4).

Para comprobar, que el fenotipo simbiótico observado en el punto 1.A.1, era causado por la complementación de las mutaciones *ndvA* y *ndvB* con los cósmidos obtenidos, se inocularon plantas de alfalfa, con los transconjugantes obtenidos de la conjugación triparental de los mutantes *ndvA* y *ndvB* con los cósmidos anteriores.

Los resultados del ensayo de nodulación se muestran en la Tabla 3, observándose unos fenotipos de nodulación similares a los obtenidos en el primer ensayo. En la Figura 17 se muestran algunos de los fenotipos simbióticos observados en este segundo ensayo.

Tabla 3. Fenotipo observado en plantas de alfalfa inoculados con las cepas de *R. meliloti* Rm102F34, LI1, Ty7 y los transconjugantes portadores de los cósmidos pMT.

Cepa inoculada	Fenotipo en plantas de alfalfa
Sin inocular	-----
Rm102F34	Nod ⁺ Fix
LI1	Nod ^a
Ty7	Nod ^a
LI1 (pMTL01)	Nod ⁺ Fix ⁺
LI1 (pMTL02)	Nod ⁺ Fix ⁺
LI1 (pMTL03)	Nod ⁺ Fix ⁺
Ty7 (pMT701)	Nod ^a
Ty7 (pMT702)	Nod ^a
Ty7 (pMT703)	Nod ⁺ Fix ⁺
Ty7 (pMT704)	Nod ⁺ Fix ⁺

a: Nódulos pequeños, blancos y vacíos de bacteroides.

De los nódulos obtenidos para cada una de las conjugaciones ensayadas, se realizaron aislamientos, comprobación de resistencias a antibióticos, extracción de los ADN plasmídicos y transformación en *E. coli* HB101. El estudio por endonucleasas de restricción de los ADNs

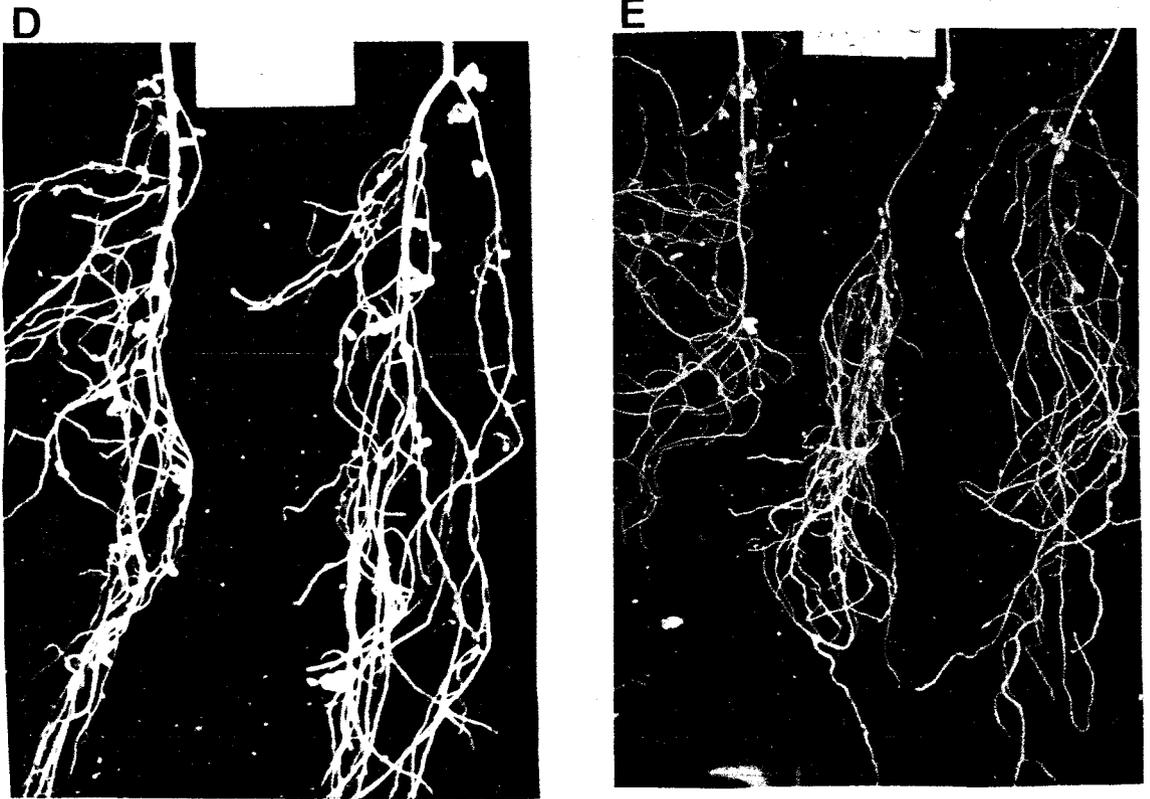
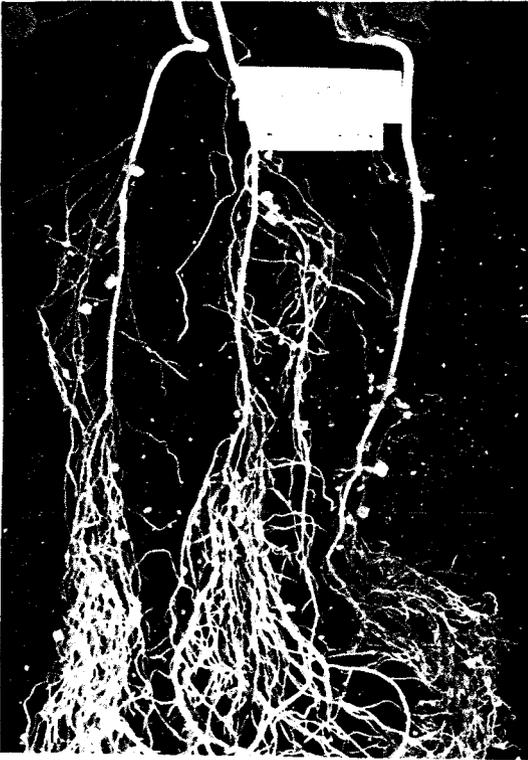


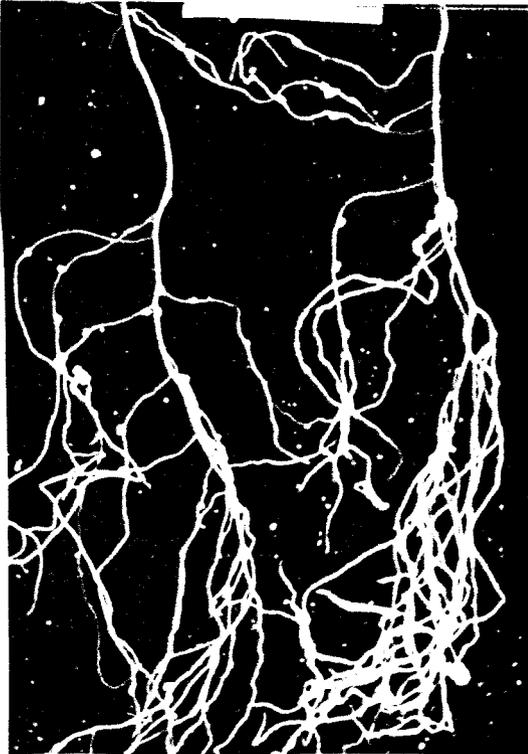
Figura 17.

Fenotipos simbióticos inducidos en plantas de alfalfa por las cepas: Rm102F34 (A), LI1 (B), Ty7 (C), LI1 (pMTL02) (D) y Ty7 (pMT703) (E).

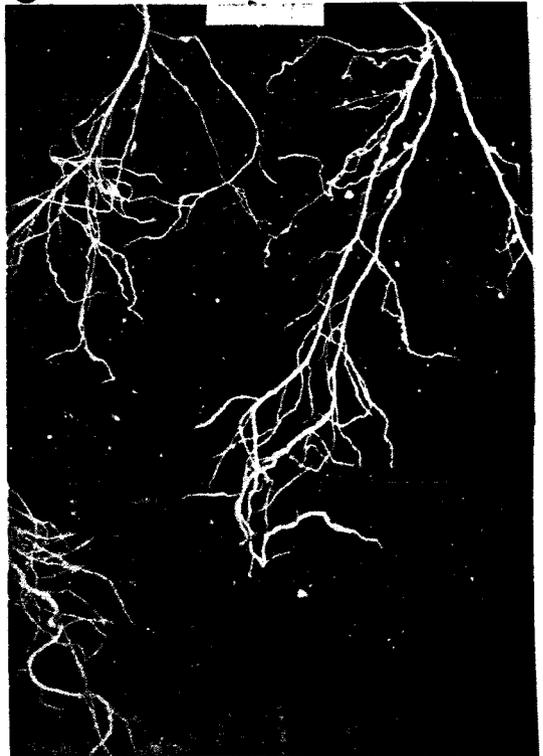
A



B



C



transformados nos permitió confirmar la presencia de los cósmidos aislados en 1. A. 1.

Coronado y col.(1989) comprobaron en CIAT899 la existencia de una copia del gen *ndvA* y dos copias para *ndvB*., así como su localización cromosómica. Estos resultados podrían explicar que en la complementación de *NdvA*⁻, todos los cósmidos aislados apareciesen solapados; por el contrario son dos grupos de cósmidos, no solapados los que complementan a *NdvB*⁻, probablemente porque cada uno de ellos contenga una de las copias de *ndvB*.

1.1.4. Localización de los genes *ndv* mediante hibridación en *R. tropici* CIAT899.

Mediante el método de hibridación no radioactivo, indicado en Material y Métodos (punto 4), intentamos la localización de los genes *ndv*, de que eran portadores los cósmidos aislados en 1. A. 1, en el genoma de *R. tropici* CIAT899.

Para ello se extrajeron los ADNs totales de las cepas de *R. tropici* CIAT899 y RSP900 (cepa curada del plásmido simbiótico), y se digirieron con la enzima de restricción *HindIII*; los cósmidos pMTL01, pMTL02, pMTL03 y pMT703, fueron igualmente digeridos con ésta enzima.

El ADN, se transfirió a filtro de nylon y se usó en una primera y segunda hibridación frente a las sondas de 2,7 kb de pMT703 y pMTL01. Estos fragmentos de 2,7 kb fueron extraídas por electrolución, y marcados siguiendo el protocolo descrito por Boehringer-Mannheim.

En la Figura 18 se muestran los fragmentos obtenidos con *HindIII* de los cósmidos utilizados y del ADN total de las cepas CIAT899 y RSP900. También se muestran los diagramas obtenidos de las hibridaciones con el marcaje no radiactivo, donde se demuestra que el fragmento de 2,7 Kb coincidente en los cósmidos pMT703 y pMTL01, pMTL02 y pMTL03 no es un fragmento homólogo, pero en ambos tipos de cósmido, definen su homología con ADN diferente al plásmido simbiótico, siendo por lo tanto genes cromosómicos o del segundo megaplásmido no simbiótico.

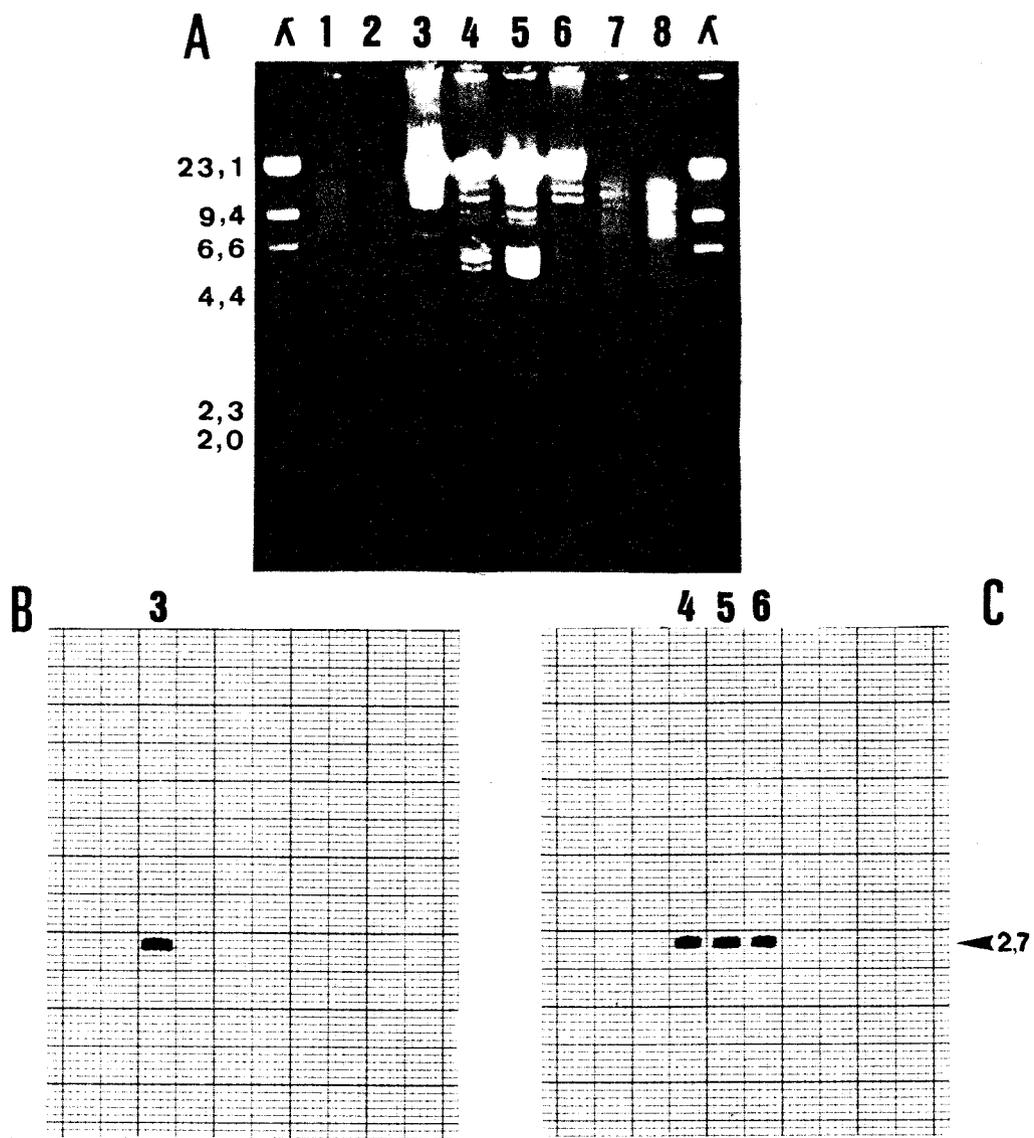


Figura 18.

A. ADNs totales de las cepas CIAT899 (carriles 1 y 8), RSP900 (carriles 2 y 7), digeridos en *Hind*III. Cósmidos pMT703 (carril 3), pMTL01 (carril 4), pMTL02 (carril 5) y pMTL03 (carril 6), digeridos en *Hind*III.

B. Diagrama de la hibridación con la sonda de 2,7 Kb de pMT703, según método no radiactivo, del gel descrito en A.

C. Diagrama de la hibridación con la sonda de 2,7 Kb de pMTL01 del gel descrito en A.

1.2. Complementación con el banco de genes de *R. tropici* CIAT899 de mutantes *exo* de *R. meliloti*.

1.2.1. Aislamiento de cósmidos que complementan a mutantes *exo* mediante selección en medio con calcofluor.

Han sido ampliamente descritos mutantes de *R. meliloti* afectados en la producción de EPS, y se sabe que mutaciones que afectan a los genes *exoA*, *exoB*, *exoC*, *exoF*, *exoL*, *exoM*, *exoN*, *exoP*, *exoQ* y *exoT* se caracterizan por la ausencia de EPS y por no brillar en medio con calcofluor (Leigh y Lee, 1988).

Para poder aislar regiones portadoras de genes *exo* en *R. tropici* CIAT899, decidimos complementar el fenotipo "dark" de las cepas Rm7031 (ExoA⁻), Rm7094 (ExoB⁻), Rm7015 (ExoC⁻) y Rm7033(ExoF⁻), para lo cual se realizó una conjugación triparental de estos mutantes con el banco de genes de CIAT899, y como cooperador el plásmido pRK2013.

Los transconjugantes fueron primero crecidos en medio TY adicionado de tetraciclina y ácido nalidíxico, y posteriormente en medio LB más calcofluor. De esta forma fue posible aislar en todos los casos transconjugantes que fueron complementados por brillar en calcofluor.

1.2.2. Ensayo en plantas de alfalfa de los cósmidos aislados en el punto 1.2.1.

De entre los transconjugantes aislados por brillo, se seleccionaron diez y posteriormente se ensayaron en plantas de alfalfa. Se quería estudiar si podían complementar, a su vez, el fenotipo simbiótico.

Los diez transconjugantes seleccionados para cada mutación, fueron recogidos en solución salina e inoculados conjuntamente a plantas de alfalfa. El ensayo se dejó durante 31 días.

Excepto para complementar mutantes *exoF*, en las otras tres se observaron nódulos fijadores. Como control negativo se usaron las cepas mutadas RM7031, Rm7094, Rm7015 y Rm7033, observándose en todos los casos la presencia de pseudonódulos.

De los nódulos obtenidos se realizó aislamiento de bacterias, comprobándose posteriormente su resistencia a los antibióticos Tc y Nl. De las bacterias así aisladas, se extrajo su ADN plasmídico y fueron transformados a *E. coli* HB101, la selección de los transformantes se realizó en medio LB adicionado de tetraciclina.

1.2.3. Análisis de restricción de los cósmidos aislados por brillo y que recuperan el fenotipo simbiótico.

En la Figura 19 se muestran algunos de los cósmidos seleccionados para los mutantes *exoA*, *exoB* y *exoC*. En el carril 1 se muestra el perfil de restricción *Hind*III del cósmido aislado pMTA01 que porta una región de ADN que complementa con el gen *exoA* de *R. meliloti*. En los carriles 6, 7 y 8 se muestran los perfiles de restricción *Hind*III de tres cósmidos (pMTB01, pMTB02 y pMTB03) que se solapan y complementan para el mutante *exoB* de *R. meliloti*, y en los carriles 2, 3, 4 y 5, se muestran los perfiles de restricción *Hind*III para los cósmidos (pMTC01, pMTC02 y pMTC03, pMTC04) que podrían indicar que en *R. tropici* exista más de una copia para el gen *exoC*.

2. MUTAGENESIS AL AZAR DE *R. TROPICI* CIAT899, CON Tn 5::*mob*.

2.1. Procedimiento de mutagénesis y aislamiento de mutantes de *R. tropici* CIAT899.

Para el aislamiento de mutantes de *R. tropici* CIAT899, se realizó una mutagénesis al azar, utilizando el trasposón Tn5::*mob*, contenido en el vector pSUP5011 y siguiendo la técnica de conjugación en membrana (M.J. Romero. T. Licenciatura. Universidad de Sevilla).

La frecuencia de trasposición obtenida fue de $1,4 \times 10^{-4}$, y la de mutación, para un fenotipo de reducción de la cantidad de EPS producido, fue de 0,37%.

Las características fisiológicas (M.J. Romero. T. Licenciatura. Universidad de Sevilla) y simbióticas observadas en los mutantes de *R. tropici* CIAT899 seleccionados, se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 20.

Tabla 4. Mutantes de *R. tropici* CIAT899 seleccionados: características fisiológicas y simbióticas.

Cepa	Fijación calcofluor ^a	Producción EPS (%) ^a	Fenotipo simbiótico	Actividad de reducción acetileno
RSP1MJ	+	15	Nod ⁻ Fix ⁻	0
RSP4MJ	+	14	Nod ^{+/-} Fix ⁻	1,66%
RSP9MJ	+	11	Nod ^{+/-} Fix ⁻	3,46%
RSP10MJ	+	15	Nod ^{+/-} Fix ⁻	0,74%
RSP21MJ	+	10	Nod ^{+/-} Fix ⁻	1,93%
RSP25MJ	-	57	Nod ^{+/-} Fix ⁻	1,76%
RSP29MJ	+	51	Nod ⁻ Fix ⁻	0
RSP30MJ	+	15	Nod ^{+/-} Fix ⁻	3,17%
RSP44MJ	+	15	Nod ^{+/-} Fix ⁻	1,07%
RSP35MJ	-	0	Nod ⁺ Fix ⁺	
RSP36MJ	-	0	Nod ⁺ Fix ⁺	

a: Resultados obtenidos por M.J. Romero (T. Licenciatura).

+: Nódulos en plantas de frijol

-: Ausencia de nódulos en la planta.

Como se muestra en la Tabla 4, todos los mutantes tienen un defecto en la síntesis de EPS y sus características simbióticas son variables.

Debido a que presentan un defecto en la síntesis de EPS, procedimos en primer lugar a analizar si cósmidos portadores de genes *exo* complementaban las mutaciones

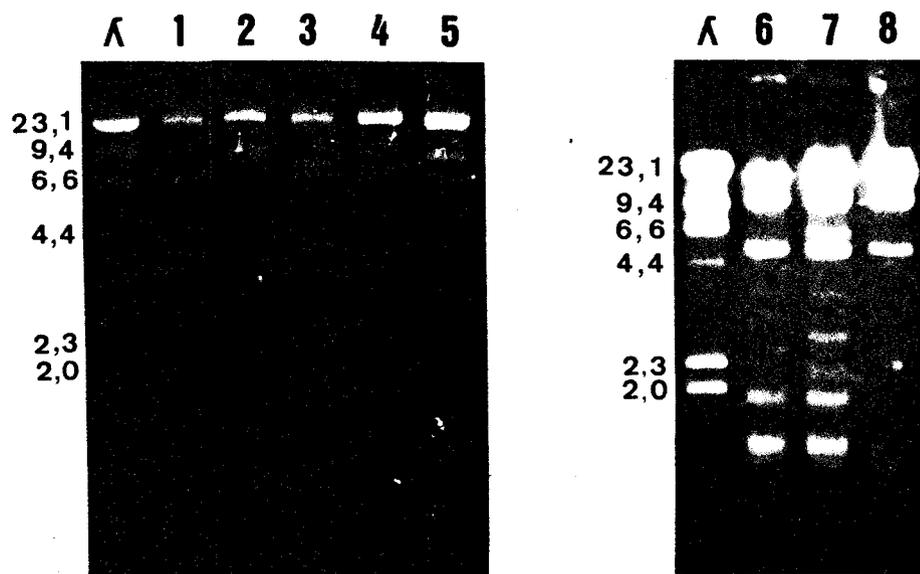


Figura 19.

Geles representativos de los cósmidos pMTA01 (carril 1), pMTC01 (carril 2), pMTC02 (carril 3), pMTC03 (carril 4), pMTC04 (carril 5), pMTB01 (carril 6), pMTB02 (carril 7) y pMTB03 (carril 8), digeridos en *Hind*III

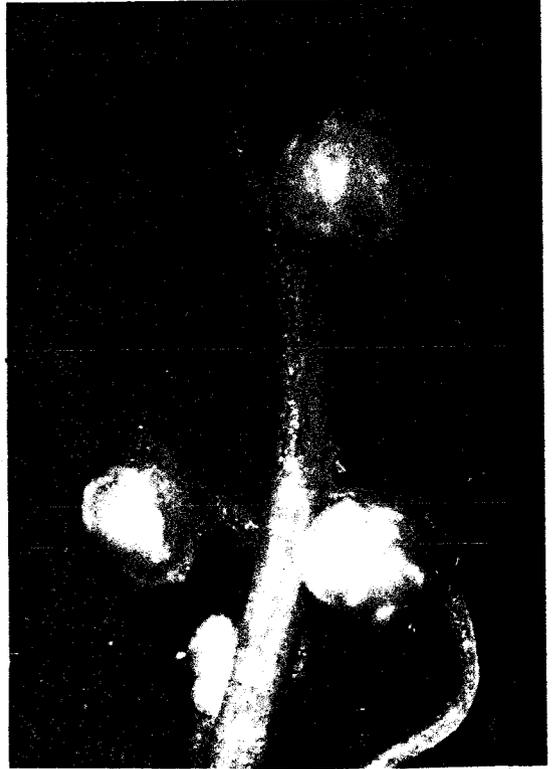
Figura 20.

Fenotipo simbiótico inducido en plantas de frijol, por las cepas: CIAT899 (A), RSP9MJ (B), RSP21MJ (C), RSP25MJ (D), RSP29MJ (E), RSP30MJ (F), RSP35MJ (G) y RSP44MJ (H).

A



B



C



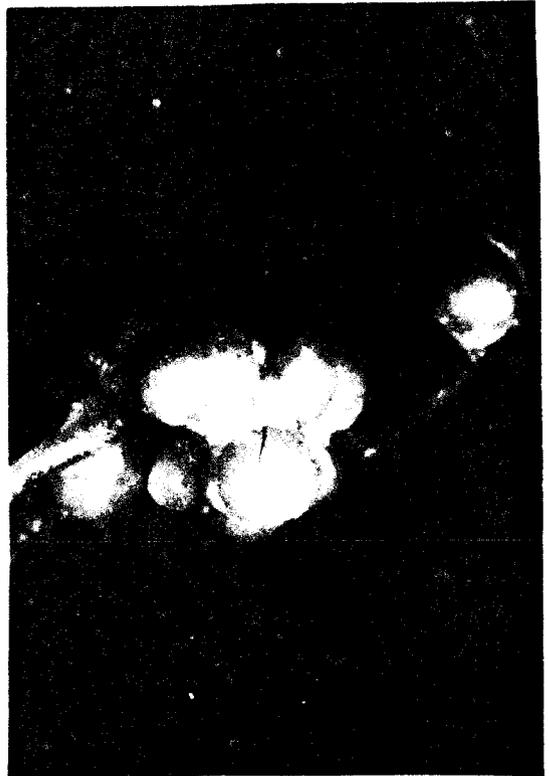
D



E



F



G



H



2.2. Estudios de complementación de los mutantes obtenidos.

2.2.1. Complementación con cósmidos portadores de regiones *exo* y *ndv* de *R. tropici* CIAT899 aislados en el apartado 2.1.

Para confirmar si las mutaciones obtenidas corresponden con genes de la biosíntesis de polisacáridos, se realizaron complementaciones con los cósmidos aislados anteriormente.

Siguiendo el protocolo que se relaciona en la Figura 21, se utilizaron como cepas donadoras los cósmidos pMT703 y pMTL01 (portadores de regiones *ndv*) y pMTA01, pMTB01 y pMTC01 (portadores de regiones *exo*) en *E. coli* HB101.

Los transconjugantes fueron seleccionados en medio TY adicionado de tetraciclina y ácido nalidíxico, y se inocularon "en masa" a plantas de frijol.

A los 21 días de la inoculación, no se observó diferencia en la nodulación entre las plantas inoculadas con los transconjugantes y las plantas inoculadas con los mutantes.

Cabe destacar que en ningún caso se obtiene complementación de las cepas RSP con los cósmidos utilizados, no estando representados en estos cósmidos los genes afectados por las mutaciones.

2.2.2. Estudio de la complementación de los mutantes obtenidos con cósmidos de genes *exo* de *R. meliloti*.

Dado que los cósmidos aislados no restablecían los fenotipos simbióticos inducidos por las mutaciones, quisimos analizar si regiones heterólogas de genes *exo* de *R. meliloti*, restablecían las características simbióticas. Para ello, utilizamos los cósmidos procedentes de *R. meliloti*: pD2 (portador del gen *exoB*), pD15 (portador del gen *exoC*), pD34 (portador de los genes *exoAMLNPK*) y pSAB104.78 (portador de los genes *exoXYFQ* de la cepa 2011).

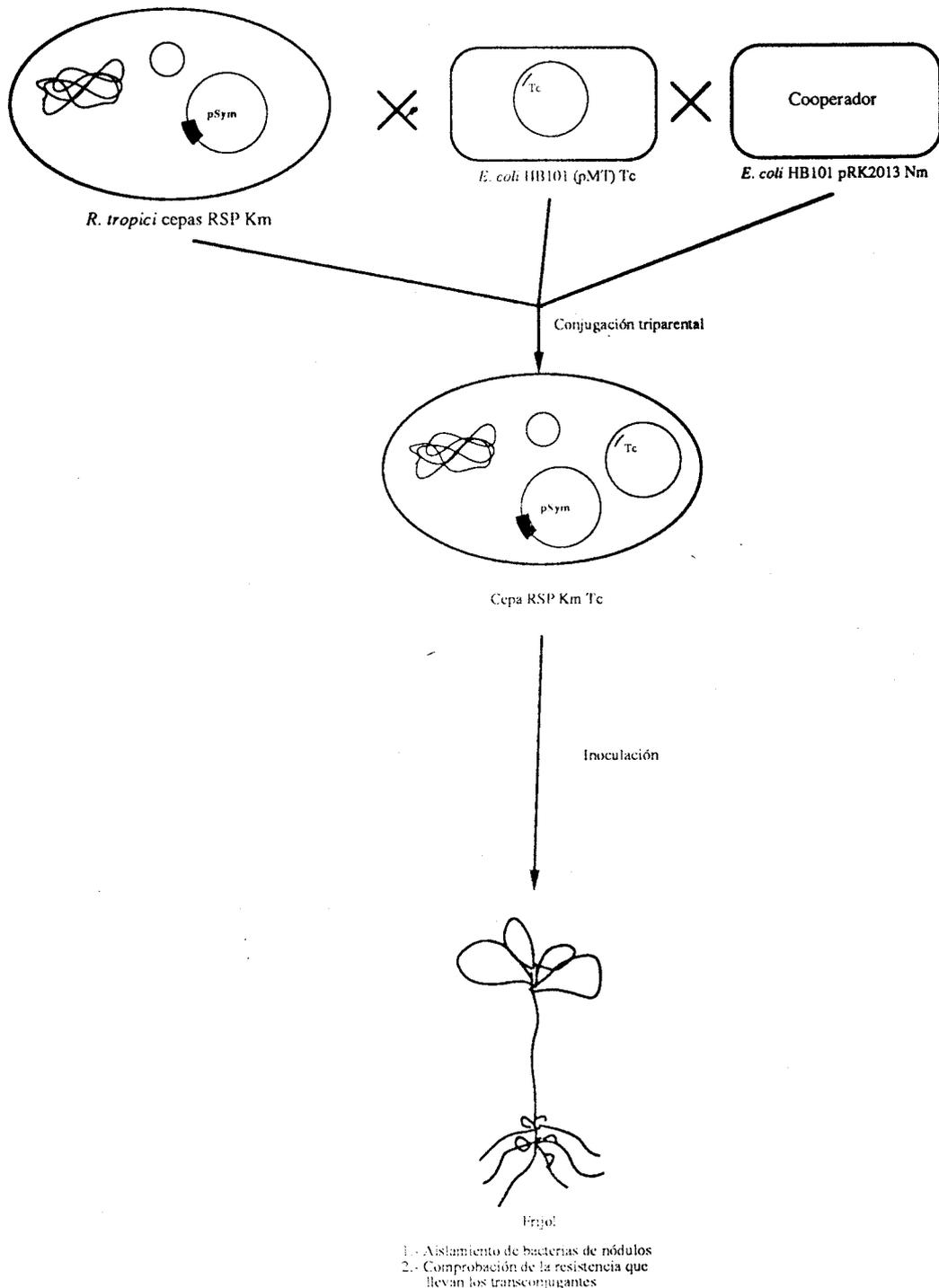


Figura 21.

Esquema seguido para el ensayo en plantas de frijol, de las conjugaciones de cepas RSP con los cósmidos pMT703, pML01, pMTA01, pMTB01 y pMTC01.

Se realizaron las complementaciones con los mutantes obtenidos y se analizaron sus fenotipos simbióticos en plantas, observándose que en ningún caso se complementaban las mutaciones estudiadas.

2.2.3. Complementación con genes de la nodulación de *R. tropici* CIAT899.

En el estudio de las mutaciones que afectaban a las cepas anteriormente descritas, se intentó recuperar el fenotipo fijador de nitrógeno por complementación con los genes *nod* de CIAT899. Se utilizó para ello el cósmido pCV38, aislado a partir del banco de genes de CIAT899 por Vargas y col. (1990), éste cósmido es portador de los genes: *nodABCDEFGHIJSU*, *nodD*, *nodPQ*, *nodH* y *nodE*. (J.L. Folch, comunicación personal).

Para esta complementación se procedió a introducir el cósmido pCV38 en las cepas mutadas, con ayuda del plásmido cooperador pRK2013; los transconjugantes fueron seleccionados en medio TY adicionado de tetraciclina ácido nalidíxico y fueron inoculados "en masa" a plantas de frijol.

En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos en este ensayo, a los 21 días de la inoculación no se observó complementación para ninguna de las conjugaciones probadas. Los nódulos inducidos eran inefectivos, no fijadores, al igual que los inducidos por los mutantes ensayados.

Tabla 5. Resultados de la inoculación en plantas de frijol, de las cepas: CIAT899, RSP y los transconjugantes portadores de pCV38.

Cepas	Fenotipo simbiótico en <i>P.vulgaris</i>
Sin inocular	-----
CIAT899	Nod ⁺ Fix ⁺
RSP ^a	Nod ^b
RSP ^a (pCV38)	Nod ^b

a: Las cepas RSP ensayadas fueron: RSP1, 4, 9, 10, 21, 25,29,30 y 44MJ.

b: Fenotipo simbiótico de nódulos inefectivos (ver Tabla 4).

En la Figura 22 se muestra el fenotipo simbiótico observado en el ensayo de nodulación en plantas de frijol, tras las inoculaciones de las cepas RSP y las portadoras de pCV38.

Estos resultados indican que ninguna de las inserciones de Tn5 afecta a genes de las primeras etapas de la infección o genes *nod*.

2.3. Aislamiento por complementación, de cósmidos del banco de genes de CIAT899 que restauran la capacidad simbiótica de los mutantes RSP1MJ, RSP9MJ, RSP10MJ, RSP21MJ, RSP25MJ, RSP30MJ y RSP44MJ.

Dado que ni los cósmidos que anteriormente se habían aislado, ni cósmidos heterólogos portadores de genes *exo*, permitían recuperar el fenotipo simbiótico de las cepas RSP, decidimos aislar del genoma de CIAT899, las regiones que complementasen estas mutaciones.

Para ello se conjugó el banco de genes de *R. tropici* CIAT899 con cada uno de los mutantes (según el procedimiento seguido en el apartado I. A. 1 de resultados) y se inocularon con la masa de conjugación hasta diez plantas de frijol, con cada uno de los mutantes complementados. Tras 21 días después de la inoculación se obtuvieron plantas donde podían observarse nódulos inefectivos junto con nódulos fijadores, como se aprecia en la Figura 23.

Posteriormente, se procedió al aislamiento de bacterias de los nódulos rojos, seleccionando en medio TY con los antibióticos apropiados.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en cada una de las conjugaciones ensayadas.



Figura 22.

Fenotipo simbiótico presentado por plantas de frijol, tras ser inoculado con las cepas RSP10MJ (A) y RSP10MJ (pCV38) (B).

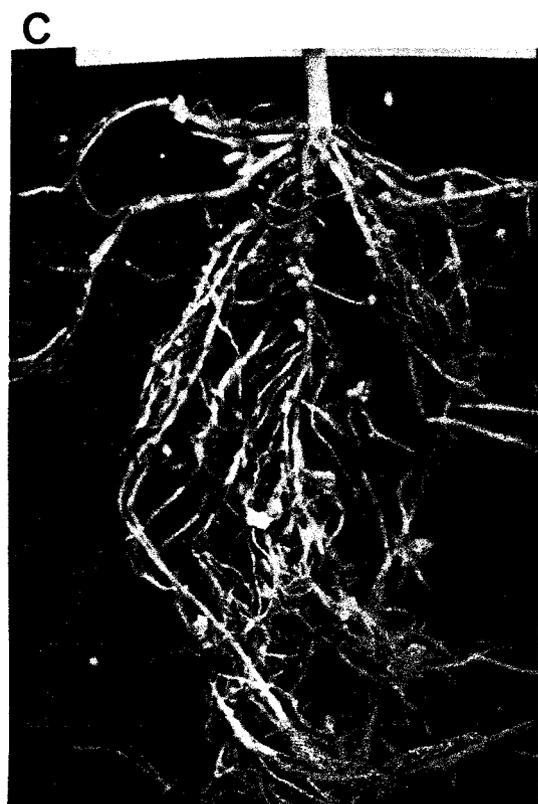
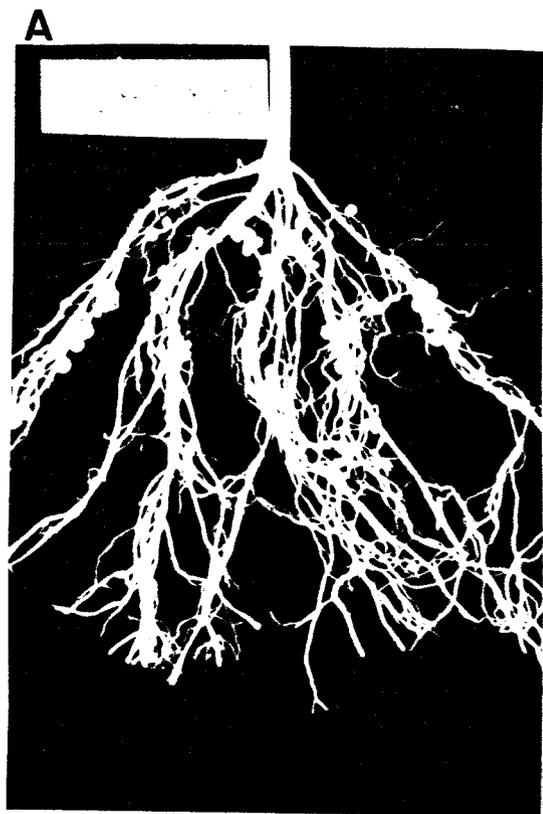


Figura 23.
Resultados del ensayo de nodulación en frijol, con las cepas: CIAT899 (A),
RSP21MJ (B), RSP21MJ x banco de CIAT899 (C).

Tabla 6:

Cepas inoculadas	% de nodulos fijadores observados respecto a la cepa silvestre
Sin inocular	-----
CIAT899	100%
RSP ^a	Nod ^b
x RSP1MJ	20-25%
x RSP4MJ	50%
x RSP9MJ	50%
x RSP10MJ	20-25%
x RSP21MJ	50%
x RSP25MJ	75%
x RSP29MJ	75%
x RSP30MJ	50%
x RSP44MJ	50%

a: Cepas RSP ensayadas fueron: RSP1, 4, 9, 10, 21, 25, 29, 30 y 44MJ

b: Nodulación presentada en Tabla 4.

x: Conjugaciones con el banco de genes de CIAT899 de las respectivas cepas RSP.

Los nódulos que aparecían de coloración roja fueron esterilizados y se aislaron en medio TY Km Tc NI, bacterias portadoras de los cósmidos del banco. El ADN plasmídico de estas bacterias fue extraído, transformado a *E. coli* HB101 y la selección de los transformantes se realizó en medio LB Tc.

Unicamente, en el caso de las complementaciones de RSP4MJ y RSP29MJ, no pudieron transformarse a *E. coli* los ADNs plasmídicos.

2.4. Aislamiento por complementación, de cósmidos del banco de CIAT899 que restauran el fenotipo calcofluor⁺ en RSP35MJ y RSP36MJ.

Por las características simbióticas (Nod⁺Fix⁺) de los mutantes RSP35MJ y RSP36MJ, la complementación con el banco de genes de CIAT899 se hizo por restauración del fenotipo calcofluor⁺.

Se aislaron tres colonias en la complementación de RSP35MJ y dos para RSP36MJ, que brillaban en medio YEM calcofluor (M.J. Romero. T. Doctoral. Universidad de Sevilla)).

De sólo una de las colonias para cada complementación, se extrajo el ADN plasmídico y se transformó a *E. coli*. A los cósmidos aislados se les llamó pMT35 y pMT36.

2.5 Analisis por restricción de los cósmidos aislados en 2.3 y2.4.

2.5.1. Digestiones y clasificación. de los cósmidos aislados en 2.3 y2.4.

A partir de los transformantes obtenidos en 2.3 y 2.4, se eligió uno para cada una de las complementaciones. Una vez extraídos sus ADNs plasmídicos, se pasó a digerir con endonucleasas de restricción y estudiar los cósmidos aislados.

Los cósmidos aislados y las mutaciones que complementan se recogen en la Tabla 7

En el análisis de restricción, los cósmidos pMT10, pMT21, pMT30 y pMT44 resultaron idénticos, ésto sugiere que las cuatro inserciones de Tn5 se encuentren en un mismo fragmento.

En la Figura 24, se muestran cortes con diferentes endonucleasas de restricción de algunos de los cósmidos aislados. En el panel A se muestran los cósmidos pMT1 (carriles 1, 2 y 3), pMT9 (carriles 4, 5 y 6), pMT21 (carriles 7, 8 y 9) y pMT25 (carriles 10, 11 y 12) digeridos con EcoRI (, EcoRI + HindIII y HindIII.

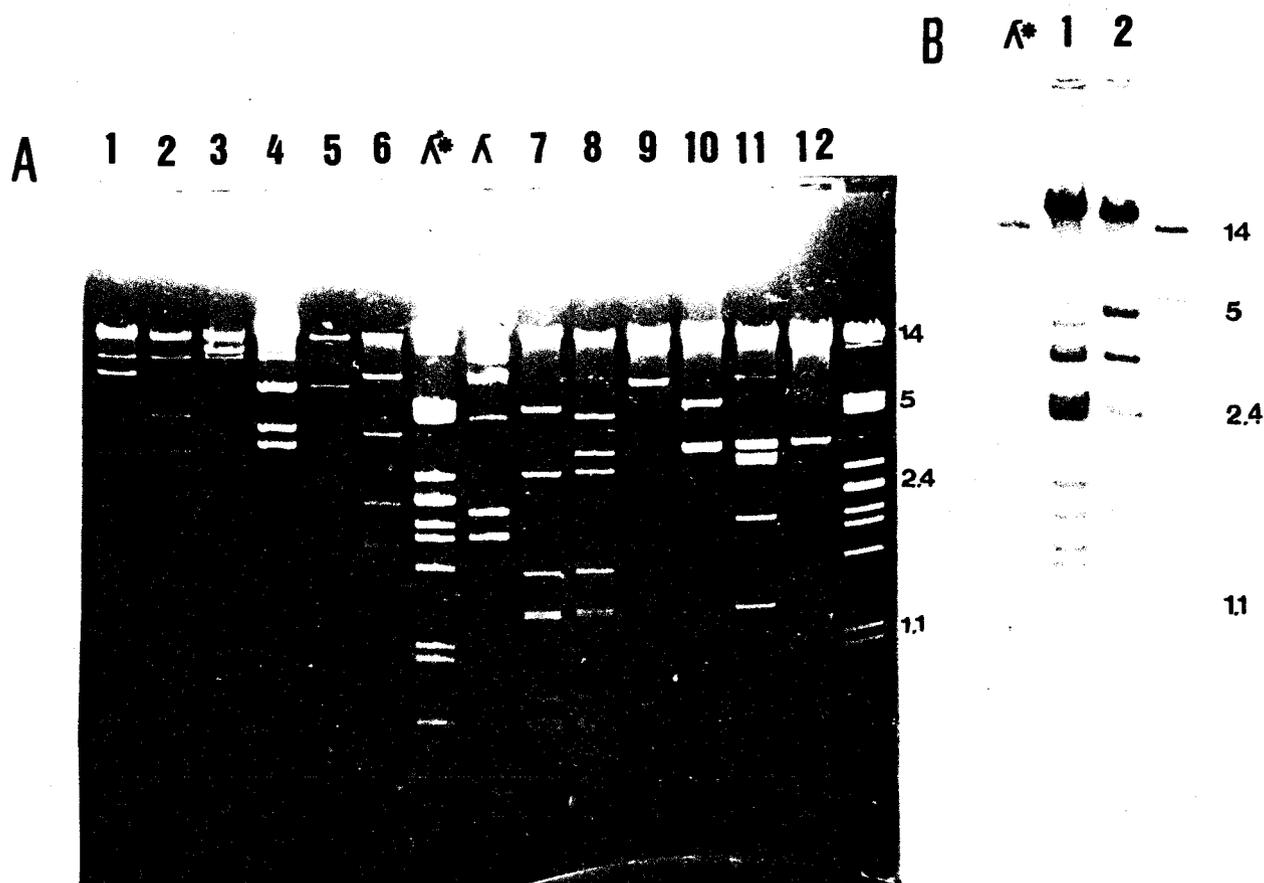


Figura 24.

A. Gel representativo de los cortes de los cósmidos pMT1 (carriles 1, 2 y 3), pMT9 (carriles 4, 5 y 6), pMT21 (carriles 7, 8 y 9) y pMT25 (carriles 10, 11 y 12), con las endonucleasas *EcoRI*, *EcoRI + HindIII* y *HindIII*.

B. Gel representativo de los cósmidos pMT35 (carril 1) y pMT36 (carril 2), con las endonucleasas *EcoRI + HindIII*.

Tabla 7. Mutantes y cósmidos aislados del banco de genes de CIAT899 que los complementan.

Cepa	Cósmido
RSP1MJ	pMT1 ^a
RSP9MJ	pMT9 ^a
RSP10MJ	pMT10 ^a
RSP21MJ	pMT21 ^a
RSP25MJ	pMT25 ^a
RSP30MJ	pMT30 ^a
RSP44MJ	pMT44 ^a
RSP35MJ	pMT35 ^b
RSP36MJ	pMT36 ^b

a: Complementación en planta.

b: Complementación en medio LB calcofluor (M.J. Romero).

2.5.2. Hibridaciones de cósmidos entre sí .

Dado que como se observa en la Figura 24 los cósmidos pMT1 y pMT21, presentaban bandas comunes, pasamos a comprobarlo mediante hibridación, además de esta forma podríamos conocer si existían otras regiones compartidas con pMT9 y pMT25.

Para ello los cósmidos pMT1, pMT9, pMT21 y pMT25 y los ADNs totales de la cepa silvestre: CIAT899, RSP900, y de los mutantes: RSP9MJ y RSP25MJ, fueron digeridos con *Hind*III, y transferidos a filtros de nylon, según Material y Métodos, punto 12.

Como primera sonda de hibridación se usó el cósmido pMT9 digerido con *Hind*III. El resultado de la hibridación se muestra en la Figura 25 B, donde pMT9 no muestra homología con los otros cósmidos. Del patrón de hibridación que presentan los carriles correspondientes a CIAT899 y RSP900, parece que este cósmido no proceda del plásmido simbiótico, al estar representado en ambas cepas.

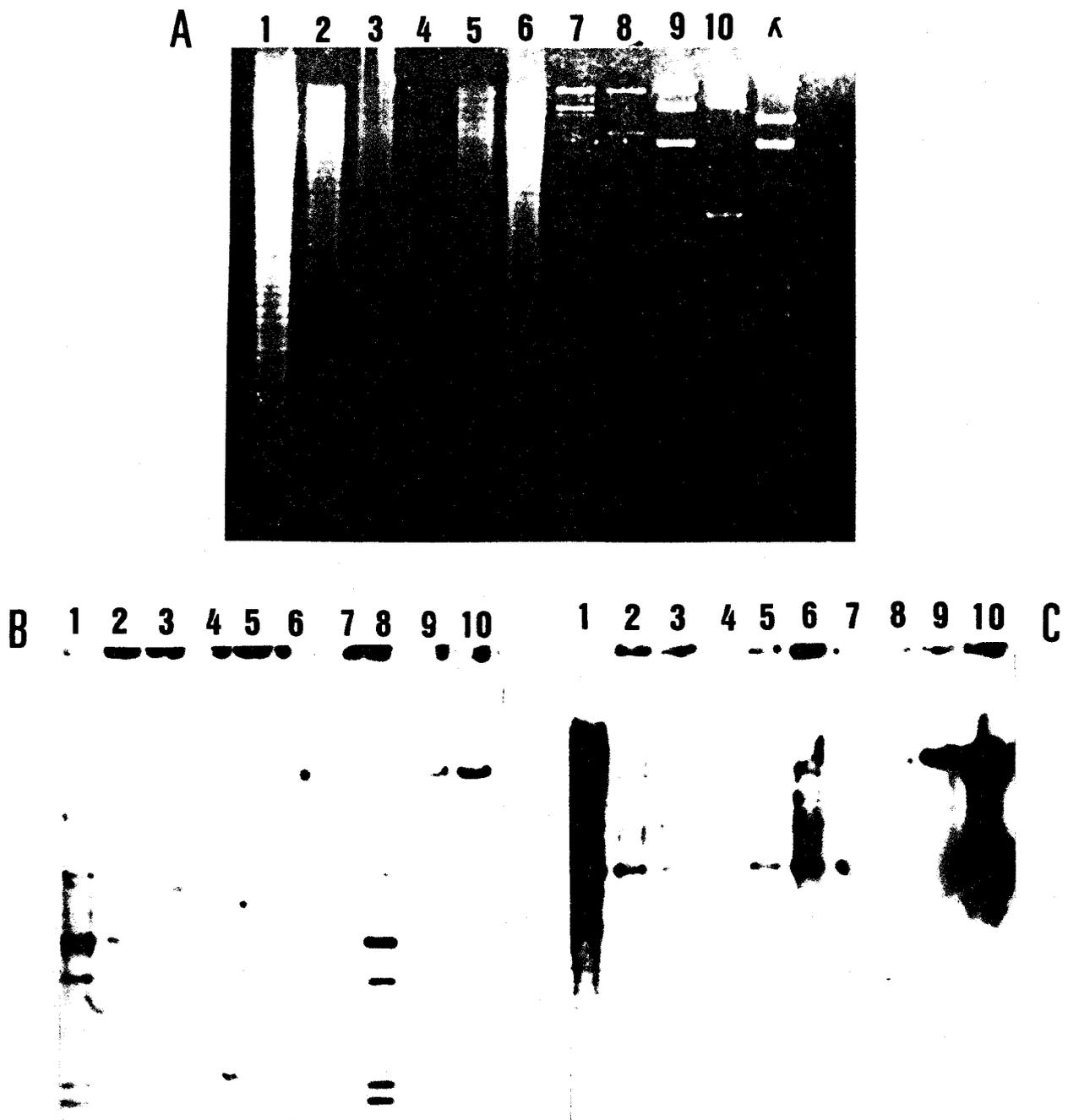


Figura 25.

A. ADNs totales de las cepas CIAT899 (carril 1), RSP900 (carril 2), RSP9MJ (carril 3), RSP25MJ (carril 4), RSP35MJ (carril 5) y RSP36MJ (carril 6) y cósmidos pMT1 (carril 7), pMT9 (carril 8), pMT21 (carril 9) y pMT25 (carril 10), digeridos con *Hind*III.

Autorradiografías tras la hibridación de los cósmidos pMT9 (B) y pMT25 (C), usados como sondas, frente al filtro descrito en A.

En la Figura 25 C se muestra la hibridación frente al cósmido pMT25, usado como sonda e igualmente digerido con *HindIII*. No se detectó homología con ninguno de los otros cósmidos, asimismo el pMT25 no se encuentra representado en el plásmido simbiótico.

2.5.3. Mapa de restricción de los cósmidos pMT1, pMT9, pMT21 y pMT25.

Para poder construir el mapa de restricción de los cósmidos seleccionados, los ADNs plasmídicos respectivos, fueron extraídos y purificados mediante gradiente de CsCl (Material y Métodos, punto 10. 2), posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción: *BamHI*, *BglIII*, *EcoRI* y *HindIII*, y las combinaciones dobles de éstas. Los geles de agarosa para establecer los puntos de restricción, se usaron a las concentraciones de 0,8% y 1,6%.

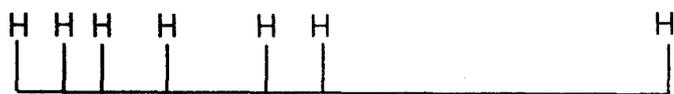
Los mapas deducidos para cada uno de los cósmidos aparecen en las Figuras 26 y 27.

2.6. Complementación cruzada de los cósmidos aislados por recuperación del fenotipo simbiótico.

Como comprobación de los resultados obtenidos en el apartado 2.5., donde los cósmidos que complementan las mutaciones de RSP10MJ, RSP21MJ, RSP30MJ y RSP44MJ aparecían idénticos, así como el solapamiento entre los cósmidos pMT1 y pMT21, decidimos ensayar en plantas las conjugaciones cruzadas entre los cósmidos y las cepas RSP de las que fueron aislados.

En la Figura 28 se muestra el método seguido desde la obtención de los transconjugantes hasta el aislamiento de bacterias a partir de los nódulos complementados.

Las cepas usadas como control aparecen en la Tabla 8, donde también se muestran los fenotipos inducidos en plantas de frijol por los transconjugantes ensayados.



pMT1



pMT21

Figura 26.

Mapa de restricción de los cósmidos pMT1 y pMT21 con *Hind*III.

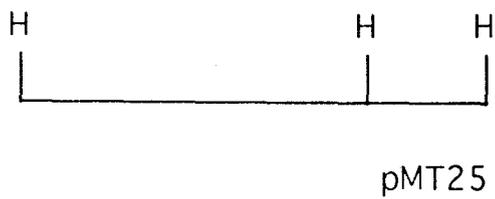
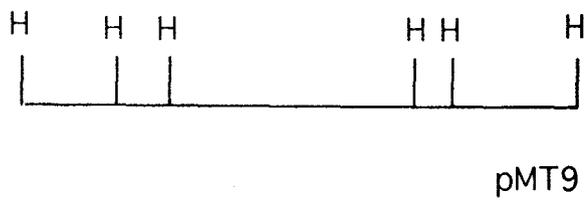


Figura 27.
Mapa de restricción de los cósmidos pMT9 y pMT25 con *Hind*III.

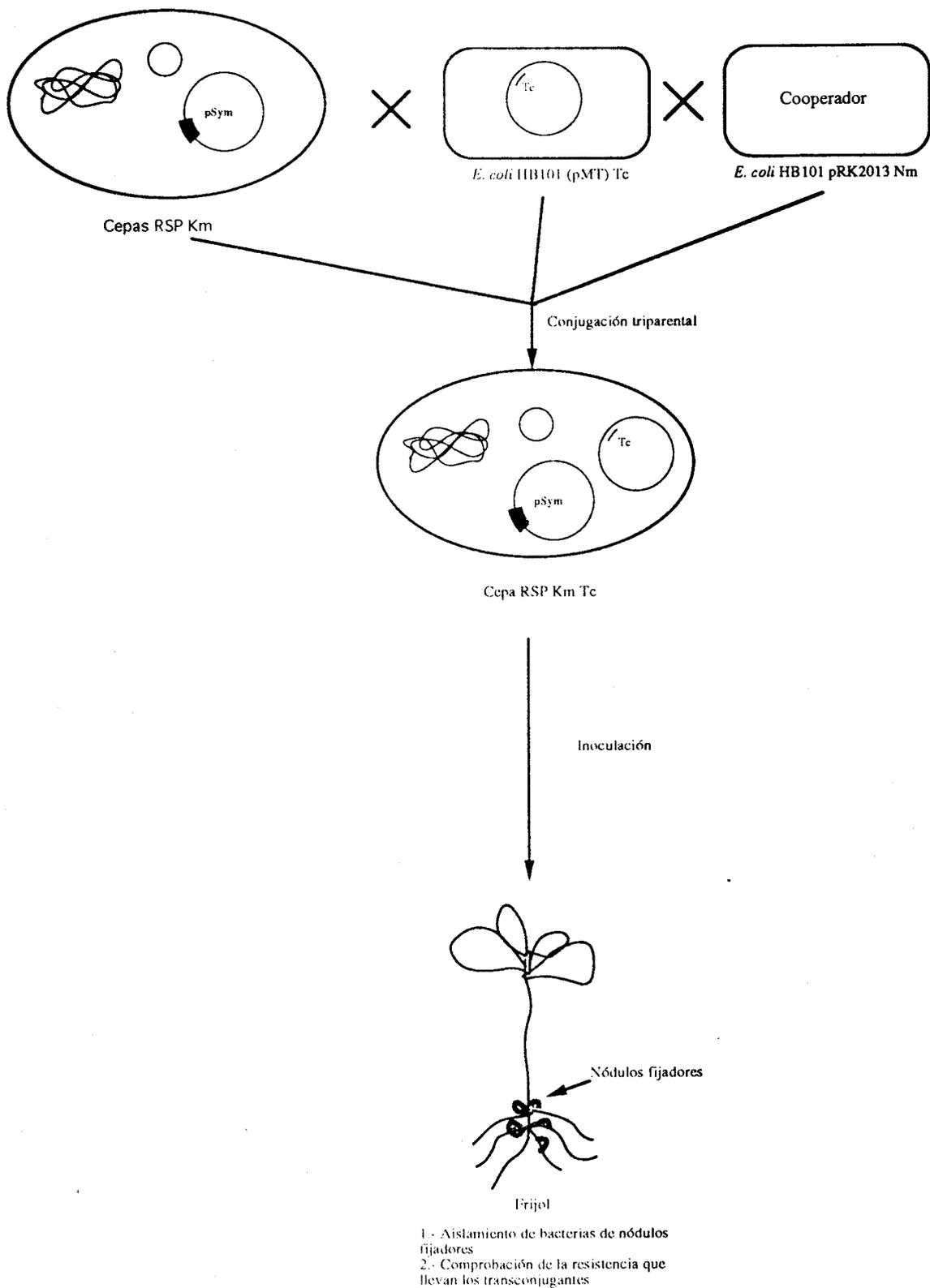


Figura 28.

Técnica seguida para el ensayo en plantas de frijol, de las complementaciones cruzadas de las cepas RSP y los cósmidos pMT del apartado II. 6.

Tabla 8. Resultados observados en planta de frijol, de las conjugaciones cruzadas entre las cepas RSP y los cósmidos pMT.

Cepas	Fenotipo en frijol.
CIAT899	Nod+Fix+
RSP ^a	Nod ^b
RSP10MJ (pMT21)	Nod+Fix+
RSP21MJ (pMT21)	Nod+Fix+
RSP30MJ (pMT21)	Nod+Fix+
RSP40MJ (pMT21)	Nod+Fix+
RSP ^c (pMT1)	Nod+Fix+
RSP25MJ (pMT1)	Nod ^b
RSP ^c (pMT9)	Nod ^d
RSP25MJ (pMT9)	Nod ^b

a: Las cepas RSP inoculadas fueron: RSP1, 4, 9, 10, 21, 25, 29, 30 y 44MJ.

b: Fenotipo simbiótico cepas RSP (ver Tabla 4).

c: Las cepas RSP ensayadas en la conjugación fueron: RSP1, 4, 9, 10, 21, 29, 30 y 44.

d: Nódulos morfológicamente iguales a los inducidos por CIAT899, pero de coloración rosada.

De los resultados obtenidos en la Tabla 8 se deduce que el cósmido pMT21 es capaz de complementar en las características simbióticas a los mutantes del mismo grupos, tales como RSP10MJ, RSP21MJ, RSP30MJ y RSP44MJ. Así también el cósmido pMT1 complementa al grupo de mutantes estudiados, salvo para el mutante RSP25MJ. El cósmido pMT9 no complementa a la totalidad las características simbióticas de ninguno de los mutantes utilizados.

De los resultados expuestos hasta ahora, se deducen claramente al menos cuatro grupos de mutantes: RSP1, 4, 9, 10, 21, 29, 30 y 44MJ con cósmidos que complementan la mutación intercambiables, y los mutantes RSP25MJ, RSP35MJ y RSP36MJ que son independientes entre sí.

En la Figura 29 se muestran algunos de los resultados en planta de las complementaciones cruzadas con el cósmido pMT21, observándose en todos los casos la aparición de nódulos rojos fijadores de nitrógeno.

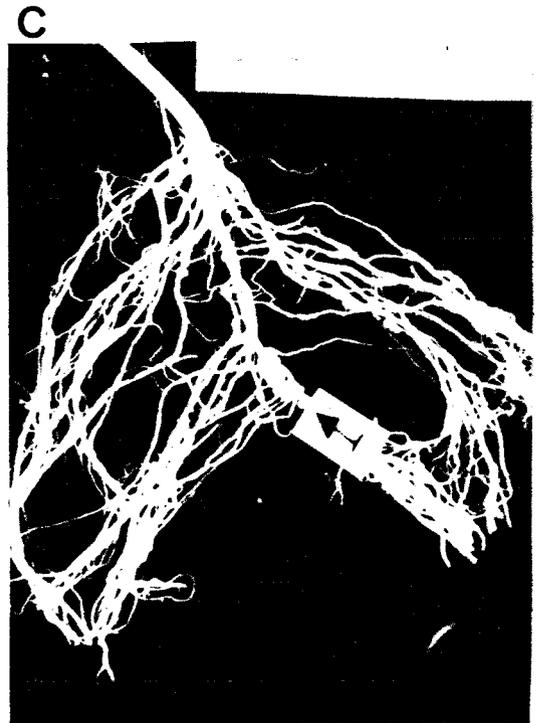
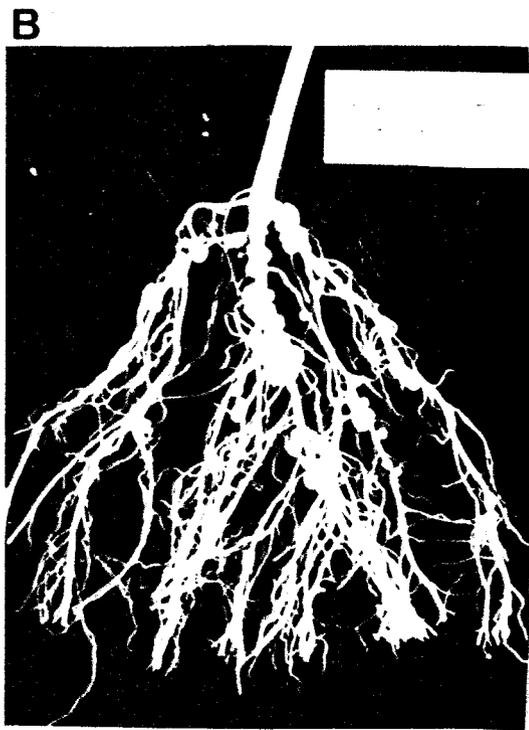


Figura 29.
Nodulación inducida en frijol, por las cepas RSP21MJ (pMT21) (A),
RSP30MJ (pMT21) (B) y RSP40MJ (pMT21) (C).

2.7. Estudio de los fragmentos subclonados de los cósmidos pMT1 y PMT9.

2.7.1. Subclonación de los cósmidos pMT1 y pMT9.

Para poder aislar fragmentos menores de pMT1 y pMT9 que complementasen las mutaciones en los respectivos mutantes, decidimos subclonar las bandas que resultaban de la digestión de estos cósmidos con *Bam*HI, en el vector pRK404. Por otra parte, ya que pVK102 no presenta puntos de corte *Bam*HI, se decidió religar los fragmentos *Bam*HI que contenían al vector. Las bandas electrofuídas de pMT1 y pMT9 *Bam*HI, fueron de 7,3 y 1,5 Kb y de 6,2, 3,0, 1,25 y 1,05 Kb, respectivamente.

Las ligaciones fueron transformadas en *E. coli* HB101, seleccionando los transformantes de las religaciones en medio LB Tc, y las nuevas construcciones en LB Tc IPTG X-Gal.

De los transformantes se aisló el ADN plasmídico y se comprobaron por digestión con *Bam*HI, las nuevas construcciones. En la Figura 30 se muestran las clonaciones obtenidas, para pMT9 no pudo aislarse la religación del vector.

2.7.2. Ensayo en planta de las construcciones realizadas.

Las construcciones obtenidas en el apartado anterior fueron ensayadas en planta. Se realizó la conjugación de éstos nuevos plásmidos con las cepas RSP1MJ y RSP9MJ, los transconjugantes fueron aislados en TY Km Tc y fueron inoculados en plantas de frijol. Los resultados obtenidos a los 21 días aparecen en la Tabla 9.

De la inoculación con la conjugación RSP9MJ x pMT904, se observaban nódulos morfológicamente iguales a los inducidos por CIAT899, pero con una tonalidad rosada, a diferencia de los inducidos por RSP9MJ que aparecen blancos. Estos nódulos rosados fueron esterilizados y se comprobó el crecimiento de bacterias en medio TY Km Tc.

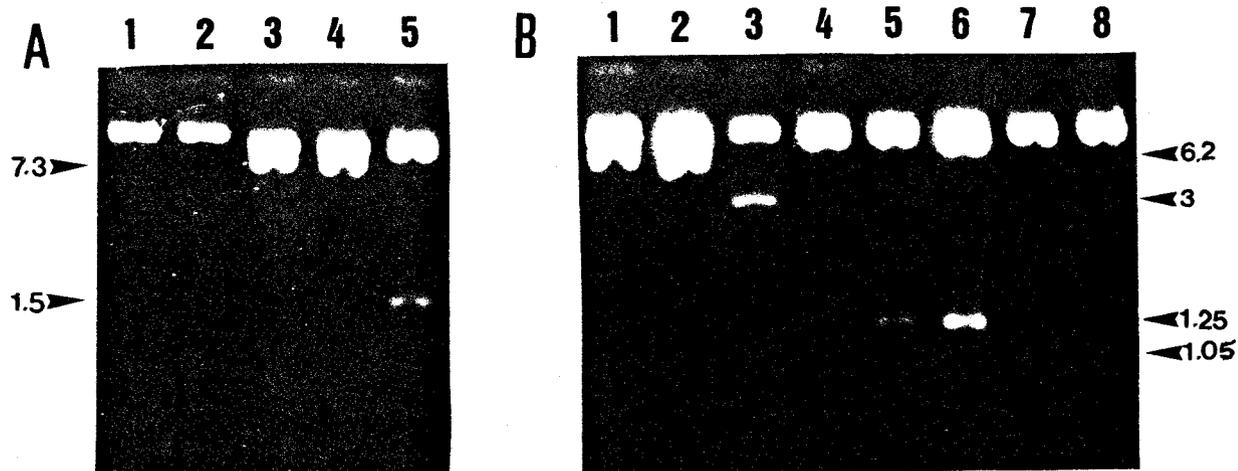


Figura 30.

A. Digestiones con la endonucleasa *Bam*HI de las construcciones: pMT101 (carriles 1 y 2), pMT102 (carriles 3 y 4) y pMT103 (carril 5).

B. Digestiones con *Bam*HI de las construcciones pMT902 (carriles 1 y 2), pMT903 (carril 3), pMT904 (carriles 5 y 6) y pMT905 (carriles 7 y 8).

Tabla 9. Cepas inoculadas y fenotipos simbióticos observados en plantas de frijol.

Cepa	Fenotipo en frijol
CIAT899	Nod ⁺ Fix ⁺
RSP1MJ	Nod ^a
RSP9MJ	Nod ^a
RSP1MJ (pMT101)	Nod ^a
RSP1MJ (pMT102)	Nod ^a
RSP1MJ (pMT103)	Nod ^a
RSP9MJ (pMT902)	Nod ^a
RSP9MJ (pMT903)	Nod ^a
RSP9MJ (pMT904)	Nod ^b
RSP9MJ (pMT905)	Nod ^a

a: Nodulación presentada en Tabla 4.

b: Nódulos iguales a los de la cepa silvestre, pero de una coloración rosada.

La inducción de nódulos rosados por ésta conjugación fue probado en un segundo ensayo, obteniéndose los mismos resultados.

Tras los resultados obtenidos en este primer ensayo, se intentó una segunda complementación de RSP1, 21 y 25MJ con el plásmido pMT904. Se observaron nódulos rosados en aquellas plantas inoculadas con RSP1MJ (pMT904) y RSP21MJ (pMT904), no así las inoculadas con RSP25MJ (pMT904) que seguían presentando nódulos blancos (Tabla 10). Las bacterias aisladas de los nódulos de tonalidad rosada fueron crecidas en medio TY Km Tc.

Tabla 10. Resultados del ensayo de nodulación en frijol.

Cepa	Frijol
CIAT899	Nod ⁺ Fix ⁺
RSP1MJ	Nod ^a
RSP9MJ	Nod ^a
RSP21MJ	Nod ^a
RSP25MJ	Nod ^a
RSP1MJ (pMT904)	Nod ^b
RSP9MJ (pMT904)	Nod ^b
RSP21MJ (pMT904)	Nod ^b
RSP25MJ (pMT904)	Nod ^a

a: Nodulación característica de las cepas RSP (Tabla 4).

b: Nódulos rosados, morfológicamente similares a los de la cepa silvestre.

2.7.3. Estudio por hibridación de la presencia del fragmento *Bam*HI clonado en el cósmido pMT904 en las mutantes RSP1, 9 y 21MJ.

Dado que el plásmido pMT904 al ser introducidos en las cepas RSP1, 9 y 21MJ les confería un fenotipo simbiótico de nódulos rosados, decidimos comprobar si el fragmento de 1,3 kb *Bam*HI de que era portador el plásmido pMT904, correspondía al que en RSP9MJ contenía la inserción de Tn5.

Para ello los ADNs totales de las cepas RSP1, 9, 21 y 25MJ, y CIAT899, digeridos con *Eco*RI y transferidos a filtro de nylon, se hibridaron frente a las 1,3 kb *Bam*HI marcados radioactivamente.

La autorradiografía de la hibridación que aparece en la Figura 31, demuestra que no es el fragmento de 1,3 kb el que en RSP9MJ contiene al Tn5; aunque corrija parcialmente la mutación.

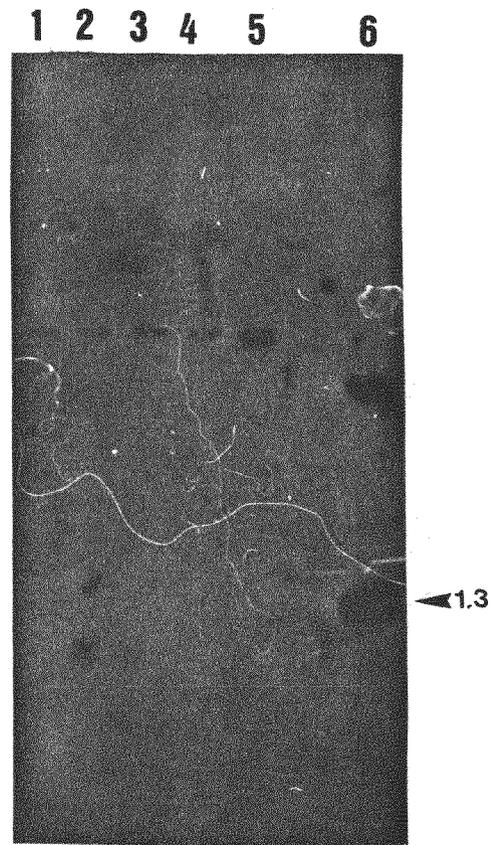


Figura 31.

Autorradiografía de la hibridación frente al fragmento de 1,3 Kb *Bam*HI de pMT904 del filtro con los ADNs totales de las cepas RSP1MJ (carril 1), RSP9MJ (carril 2), RSP21MJ (carril 3), RSP25MJ (carril 4) y CIAT899 (carril 5), digeridos con la endonucleasa *Eco*RI. El carril 6 corresponde a la digestión del plásmido pMT904 en *Bam*HI.

La misma sonda de 1,3 kb *Bam*HI de pMT904, se hibridó frente al filtro que contenía los cósmidos pMT1, pMT9, pMT21 y pMT25 digeridos con endonucleasas de restricción (Figura 32 A). Con esta hibridación quisimos comprobar si este fragmento de 1,3 Kb de pMT9 estaba representado en alguno de los otros cósmidos.

El resultado de la hibridación se muestra en la Figura 32 B, donde no se observó ninguna señal de homología de este fragmento, en pMT1, pMT21 o pMT25.

2.7.4. Secuenciación del fragmento *Bam*HI de pMT904.

Por los resultados de complementación de las cepas RSP1MJ, RSP9MJ y RSP21MJ con el plásmido pMT904 donde se observaba la restauración del fenotipo simbiótico de nódulos blancos, no fijadores, a nódulos rosados con cierta actividad nitrogenasa, decidimos iniciar la secuenciación del fragmento de 1,3 kb *Bam*HI e intentar encontrar una homología con secuencias ya publicadas.

Para ello las 1,3 kb *Bam*HI electroluídas por Geneclean^R II fueron clonadas en el vector pSK⁺, previamente digerido con *Bam*HI. Los transformantes de esta ligación fueron seleccionados en LB Amp IPTG X-gal. El análisis de los transformantes con la endonucleasa *Bam*HI, confirmó el aislamiento de la clonación: pSMT904

El mapa de restricción del plásmido pSMT904 se hizo tras la digestión del ADN plasmídico con las endonucleasas: *Bam*HI, *Bgl*II, *Sal*I y sus combinaciones dobles. El mapa de restricción que de pSMT904 aparece en la Figura 33.

2.7.4.1. Estrategia de secuenciación.

Tras el mapa de pSMT904 que se muestra en la Figura 33 se decidieron los fragmentos a subclonar en los vectores pBluescript de Stratagene y en el vector M13mp18.

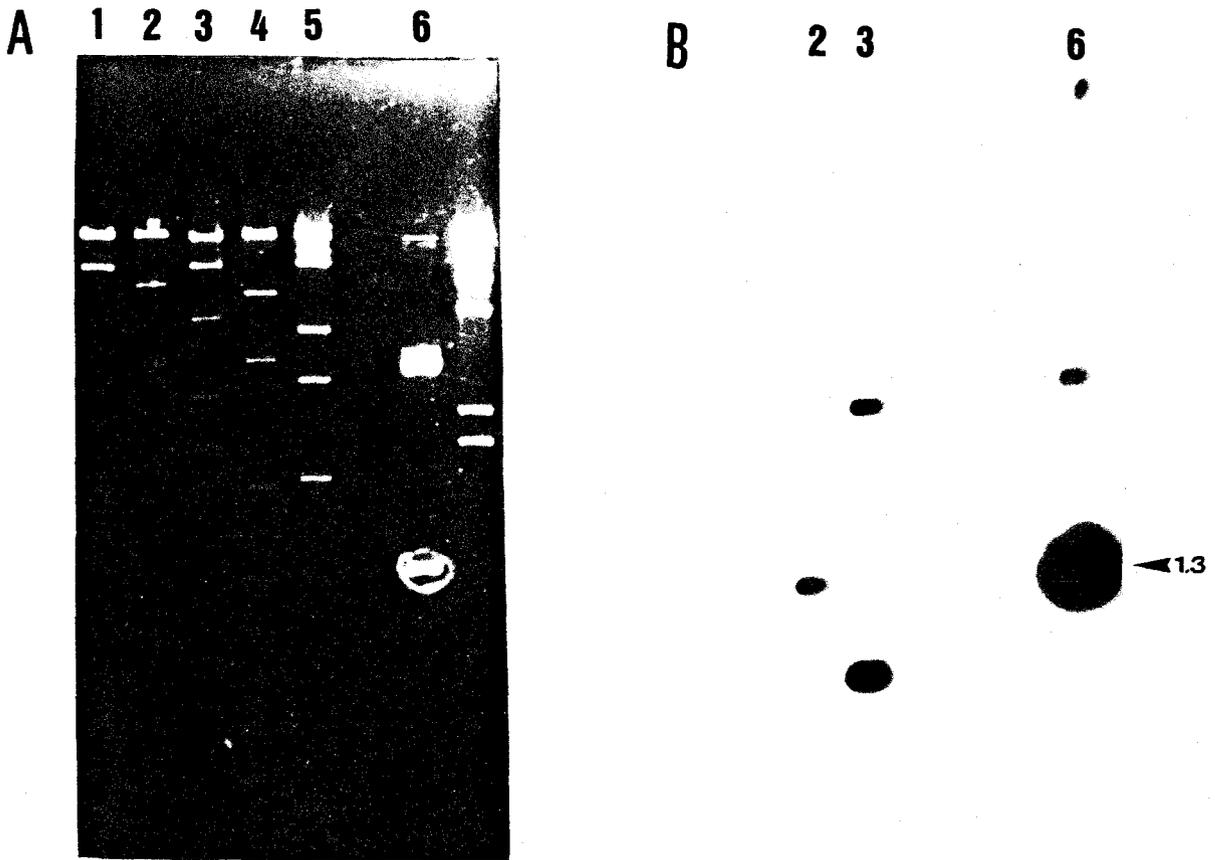


Figura 32.

A. Gel correspondiente a las digestiones de los cósmidos pMT1 en *EcoRI* (carril 1), pMT9 en *BamHI* (carril 2), pMT9 en *HindIII* (carril 3), pMT21 en *EcoRI* (carril 4), pMT25 en *BglIII* (carril 5) y del plásmido pMT904 en *BamHI* (carril 6).

B. Autorradiografía de la hibridación del gel descrito en A, frente a la sonda de 1,3 Kb *BamHI* del plásmido pMT904.

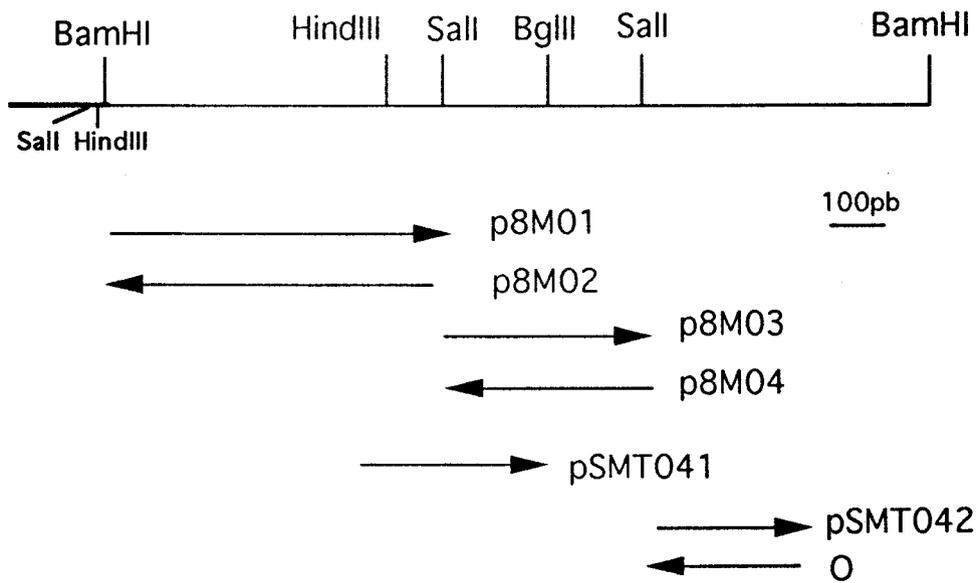


Figura 33.

Estrategia de secuenciación del fragmento de 1,3 KB BamHI de pMT904. Las flechas horizontales indican las suclonaciones realizadas, así como el sentido de la secuenciación. Los puntos Sall y HinIII indicados en negrita corresponden al vector pSK. O: oligonucleótidos de apoyo.

El vector pBluescript (pSK⁺) fue seleccionado por contener un sitio de clonaje múltiple (scm) con 26 dianas únicas de restricción interrumpiendo al gen *lac Z*; y por ser portador del gen de resistencia a ampicilina (Figura 34 A)

El vector M13mp18, es derivado de bacteriófago M13 y se caracteriza por ser portador de un "polylinker" con sitios de reconocimiento para 13 enzimas de restricción. Se eligió para facilitar la obtención de ADN monocatenario para la secuenciación (Figura 34 B).

En la Figura 33 se muestra un esquema de las subclonaciones en pSK⁺ y M13mp18 a partir de pSMT904, también se indica el sentido en el que se ha realizado la lectura de la secuencia en cada uno de ellos.

Estas nuevas construcciones fueron transformadas a células de *E.coli* cepa CMK y los transformantes fueron seleccionados por su crecimiento como colonias blancas, en medio LB Ap IPTG X-gal, para las construcciones en pSK; y por la aparición de placas de lisis de una coloración blanca en medio LB IPTG X-gal para las construcciones en M13mp18.

pSMT041 y pSMT042, fueron obtenidas por religación sobre ellos mismos de los fragmentos de 3.800 pb *Hind*III y 3.457 pb *Sal*I de pSMT904. Fueron electroluídos por GeneClean^R II, religados sobre sí y transformados a *E.coli* CMK. p8M01, p8M02, así como p8M03 y p8M04 corresponden a las distintas orientaciones de los fragmentos *Sal*I, indicados en la Figura 33, en el vector M13mp18.

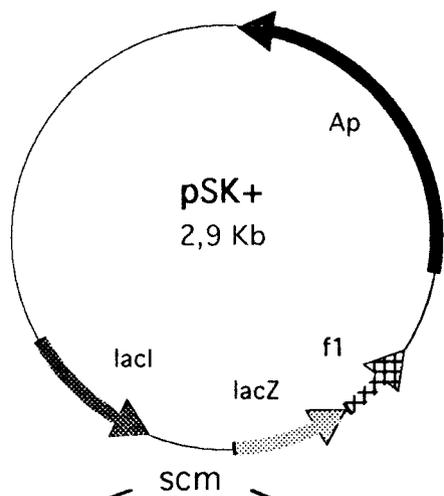
2.7.4.2. Determinación de la secuencia.

La secuenciación del ADN de doble o de cadena sencilla, de los plásmidos obtenidos en el apartado anterior, se llevó a cabo siguiendo el método enzimático de terminadores de cadena descrito por Sanger (Sanger y col., 1977) y utilizando la DNA-polimerasa del bacteriófago T7 modificada ("Sequenase version 2.0"). Para aquellos casos de aparición de estructuras secundarias, por un alto contenido de C+G, las reacciones se hicieron con ITP (nucleótido análogo al GTP que desestabiliza las estructuras secundarias del DNA).

Figura 34.

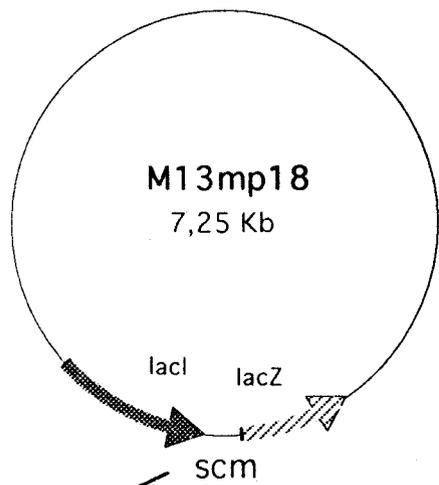
Mapas circulares de los vectores pSK(A) y M13mp18 (B), donde se señalan el origen de replicación del bacteriófago f1, los genes *lacI* y *lacZ* y el gen de resistencia a ampicilina (Ap). Se muestran los sitios de clonajes múltiples de ambos vectores con algunas de las dianas de restricción únicas que contienen.

A



SacI XbaI BamHI SmaI PstI EcoRI EcoRV HindIII SalI XhoI KpnI

B



EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI XbaI SalI PstI SphI HindIII

En la Figura 35 se muestra la secuencia de nucleótidos obtenida a partir del fragmento de 1,3 kb *Bam*HI pSMT904 secuenciado.

El análisis de la secuencia obtenida mediante el programa GCG y Straider, nos permitió obtener el mapa gráfico de los sitios de restricción únicos, así como el de las posibles fases de lectura abierta, estos mapas se muestran en las Figuras 36 y 37.

La comparación de la secuencia nucleotídica obtenida, con las contenidas en el banco EMBL/Genbank, mediante el programa FASTA del paquete GCG, encontró una homología que se recoge en la Figura 38.

3. ANALISIS GENETICO DE LOS MUTANTES.

3.1. Clasificación de las mutaciones por hibridación frente a *Tn5::mob*

Para poder estudiar el lugar de inserción de *Tn5* en los distintos mutantes RSP, y teniendo en cuenta las dianas de restricción de *Tn5::mob* (Figura 39), decidimos digerir los ADNs totales de las cepas mutadas con las enzimas *Sal*I y *Eco*RI.

Figura 35.

1 AGCGCGATGA ACCGCATTGA TTCTGCCGTC GCGAATCCTT CTTCGGTAAA
51 GGGGGTGC GC TCGTGGACCA CGTACCGAAA GATTGCGCAG ATCGCTTGTC
101 GCCGCGGCTG CCAAGAGGGG GATACGCGCC TCTGAGCTCA GTATGTAGGC
151 GGCAACGACT CTTTGTTGCC CTCAAGTACG CGGCCGATAT CTGGCTTGCC
201 CGCTTCTCGT ACGCGTGC GT CTCGATGATG AAGGCAGGTG AGGTTCGCAA
251 ACTGCTCATT GATATGGTAT CGAAACCGAC GCCGCTGAAT ACGTCCAGTG
301 ATGCATGGTC TCTGCGACAT CATCACCTCC CGTGTCTGAC GACAACGTGC
351 GATCACCGAT CATCGTCCTG CCGTTGCACC TGCCGCGAAG TTGTCAACGC
401 CCACGAAATC CGAGGCGGGA AGCTTTTAGA AATTGGACGA CCTTGATGTC
451 CCTTCCAGA AGCCGCATCA AGGCATCGCG CACCTGGGGC GATTCCGGCG
501 CCATCACGGC TATNGCCGTT CGGACGGGTG TCCTCGCTGA TGCCGGTCAG
551 ATATTTGCGA ACACCGTGGG CGCGCTCTTC GGTGGGGATC TGAACGCAGT
601 CTATATCGGT CAGGTCGCTT TTAAGCGCCG CTCTCAAGAT TCTCCACCCG
651 GCGCAACAGC TCGCCAAGAT AAAGATCTCC TGA CTTCGGC AGGATGAACC
701 GAAACTTGTA GCTCTTG TTC GTGCGAGGCT GACGGCGGCA GGGTTTCGGA
751 TAAAGCCAAT GGCTTCAATG GCTTCTTGAA GCTGCGGGCG GCTTTTTTGC
801 TCACATTGGG GCGATGTTCA AAACCCGGTC GACTGTGGCA AGGCTTACGC
851 CGCGGCTTCC GCAAGGTCCT TTCGTGTTGG CCGCATGATA GCTCCACTTG
901 AATTACAGAC AGCAGACATT TCCCTCAAAA ACGAGAGAAA GGCAAGAATT
951 GATGTGCGGA CCTCAAAAAC TGCTTGCATT GAGGTGCGCA CCTCAGTTAT
1001 TCTTATGTGC C

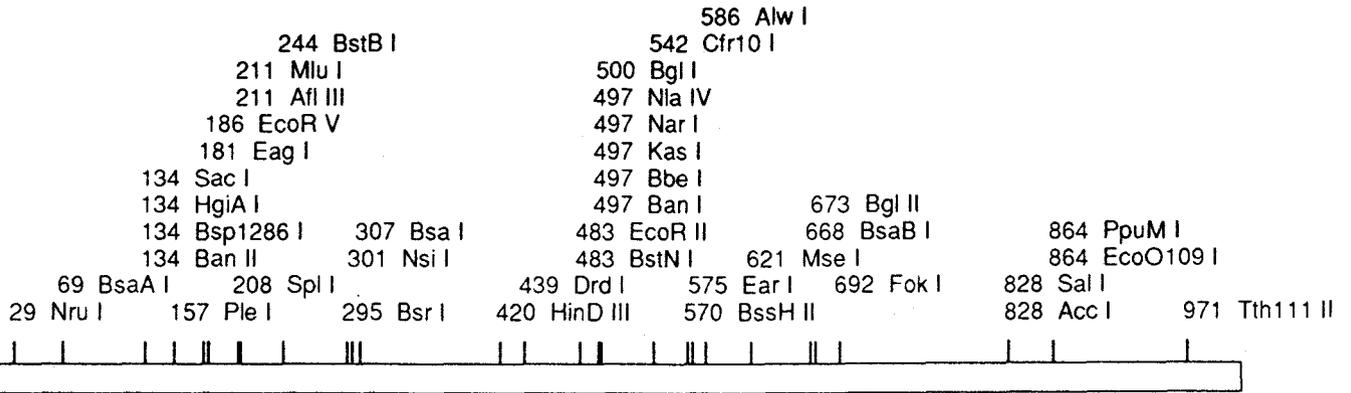


Figura 36.

Mapa de los sitios de restricción únicos encontrados en la secuencia presentada en la Figura 35.

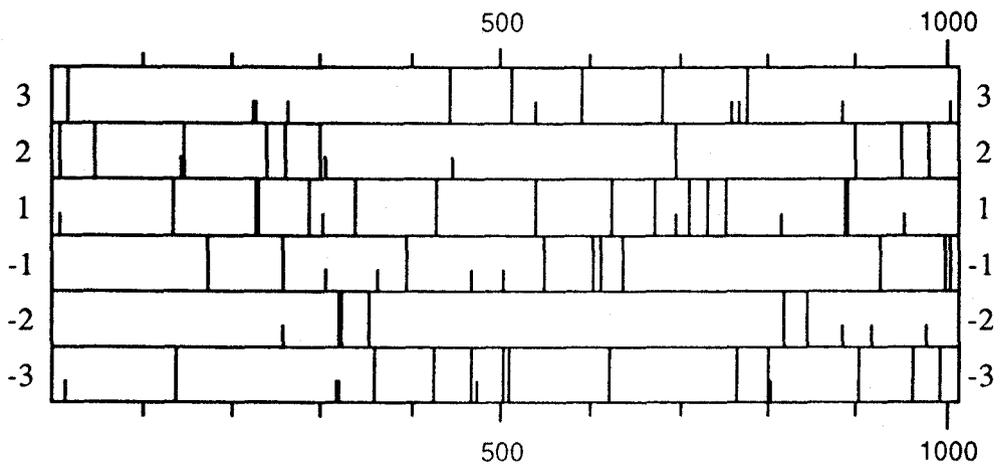


Figura 37.

Mapa de las posibles fases de lectura abierta, encontradas sobre la secuencia mostrada en la Figura 35.

LOCUS PSEARGRA 4408 bp ds-DNA BCT 15-MAR-1990
 DEFINITION P.aeruginosa alginate regulatory proteins AlgR2 and AlgR3, complete cds.
 ACCESSION M30145
 KEYWORDS arginate regulatory protein; regulatory protein.
 SOURCE P.aeruginosa (strain 8830) DNA. . . .

SCORES Init1: 62 Initn: 99 Opt: 119
 52.7% identity in 328 bp overlap

```

      350      360      370      380      390      400
Pmt 904 CGAGCTGTTGCGCCGGGTGGAGAATCTTGAGAGCGGGCGCTTAAAAGCGACCTGACCGATA
                ||| ||||| | | ||| | |
Psearg GCCTGCCGCGGGCAGCAACGGCGCCCGCCCGACCGCCTCCTAAGGCGCTGTCTG-CA
      3060      3070      3080      3090      3100      3110

      410      420      430      440      450      460
Pmt 904 TAGACTGCGTTCAGATCCCCACCGAAGAGCGCGCCACGGTGTGCG---AAATATCTGA
                || | || | | | ||| | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Psearg AAGCCGCCGAGCCAAGCACCAGCAAAGCCCG-GCGCTCTG-CTCCGTGCAGATGTCCCG
      3120      3130      3140      3150      3160      3170

      470      480      490      500      510
Pmt 904 CCGGCATCAGCGAGGACACCCGTCGGAACGGCNATAGCCGTGATGGC-----GCCGGAA
                | ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Psearg GCTGCAGGCTTGCAGCCAGGCATCCGCACTGCGATTTCGCTTCTCTGGCCCTCCAGCCAGGC
      3180      3190      3200      3210      3220      3230

      520      530      540      550      560      570
Pmt 904 TCGCCCAGGTGCGCGATGCCTTGATGCGGCTTCTGGAAAG---GGACATCAAGGTCGTC
                | ||||| || | || || | | | | | | | | | | | | | | | |
Psearg TGTGGCCAGGTGCGCCAGGCGTTGCAGGTGTTCCCGTTCGCTCGTAGTTCCTGGGCCTT
      3240      3250      3260      3270      3280      3290

      580      590      600      610      620      630
Pmt 904 CAATTTCTAAAAGCTTCCCGCC--TCGGATTTTCGTGGGCGTTGACAACCTTCGCGGCAGGT
                || ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Psearg CATTCCTCGCGGAGTTCGGCCAGGCAGGCGTCGTGG--GTTG-CCGCTTCGCGCCAGGC
      3300      3310      3320      3330      3340      3350

      640      650      660      670      680      690
Pmt 904 GCAACGGCAGGACGATGATCGGT--GATCGCACGTTGTCGTCAGACACGGGAGGTGATGA
                ||||| ||| | | ||| ||| | || ||| ||| ||| ||| ||| |||
Psearg GCAAC-GCAATCTGCGCAGGGGTTTCGATGACCGTTTCGCGCCAGGGACGCGGGCGTTCT
      3360      3370      3380      3390      3400

      700      710      720      730      740      750
Pmt 904 TGTCGCAGAGACCATGCATCACTGGACGTATTCAGCGGCGTCGGTTTCGATACCATATCA
Psearg CCAGGATCTGGGCGGTTCTTTTCGAGCAGCTCACACCGCGCCTGCCAAGCCAGGCGGCGA
      3410      3420      3430      3440      3450      3460

```

Figura 38.
 Homología nucleotídica encontrada de la secuencia de la Figura 35, en el banco EMBL, según programa FASTA.

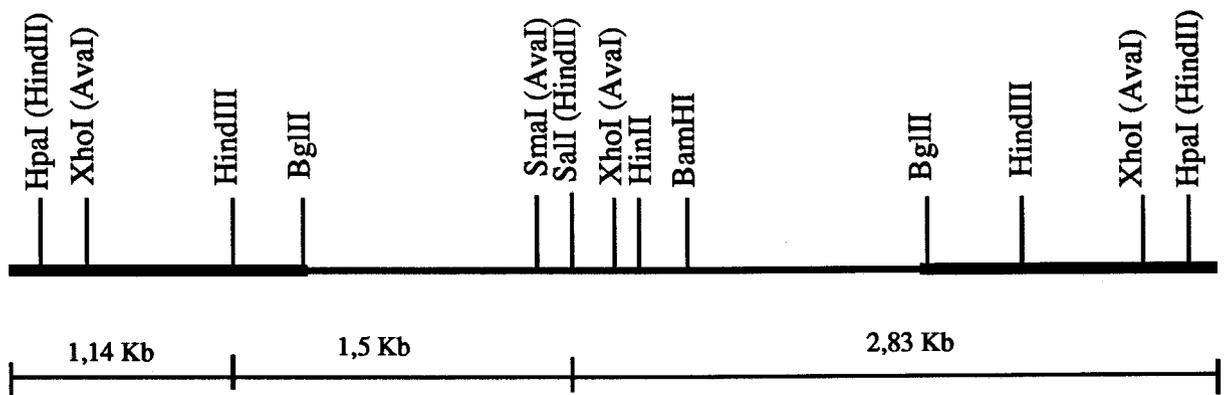


Figura 39.

Mapa de algunas de las dianas de restricción y distancia en kilobases, sobre Tn5. El fragmento *mob* se encuentra clonado en el sitio *Bam*HI (Simon, 1984).

En primeras hibridaciones, frente a la sonda de Tn5, de los filtros que contenían los ADNs digeridos, se observó que las cepas RSP1, 4, 9, 10, 21, 29, 30 y 44MJ presentaban un mismo patrón de hibridación; e igual fue el caso de RSP35 y 36MJ.

Estos resultados nos permitieron agrupar las cepas RSP en tres grupos, cada uno de los cuales aloja Tn5 en un mismo fragmento *Eco*RI o *Sal*I. Un primer grupo sería el formado por RSP1, 4, 9, 10, 21, 29, 30 y 44MJ; RSP35 y 36MJ un segundo grupo y como mutación única, RSP25MJ.

En la Figura 40 aparece el patrón de hibridación de los ADNs totales digeridos con *Sal*I y *Eco*RI, para cada una de las insercciones de Tn5 clasificadas.

3.2. Localización de las mutaciones en el genoma de *R. tropici*.

Para determinar si las insercciones de Tn5 en las cepas RSP eran plasmídicas o cromosómicas, se hibridó el gel correspondiente al perfil de plásmidos de las cepas CIAT899, RSP9, 25 y 36MJ (Figura 41 A), frente a la sonda radioactiva de Tn5. Como control de la hibridación se utilizó la

1 2 3 4 5 6 7 8

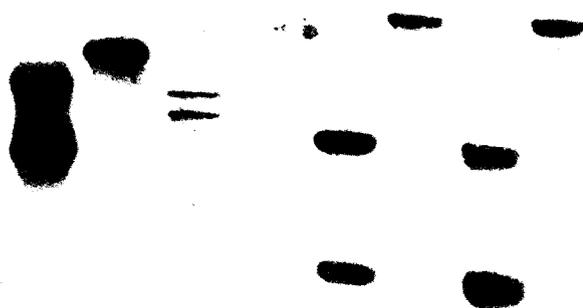


Figura 40.

Autorradiografía de la hibridación con la sonda del fragmento *Hind*III interno en *Tn5-mob*, frente a los ADNs totales de las cepas RSP1MJ (carriles 1 y 2), RSP25MJ (carriles 3 y 4), RSP35MJ (carriles 5 y 6), y RSP36MJ (carriles 7 y 8), digeridos con *Sal*I y *Eco*RI, respectivamente.

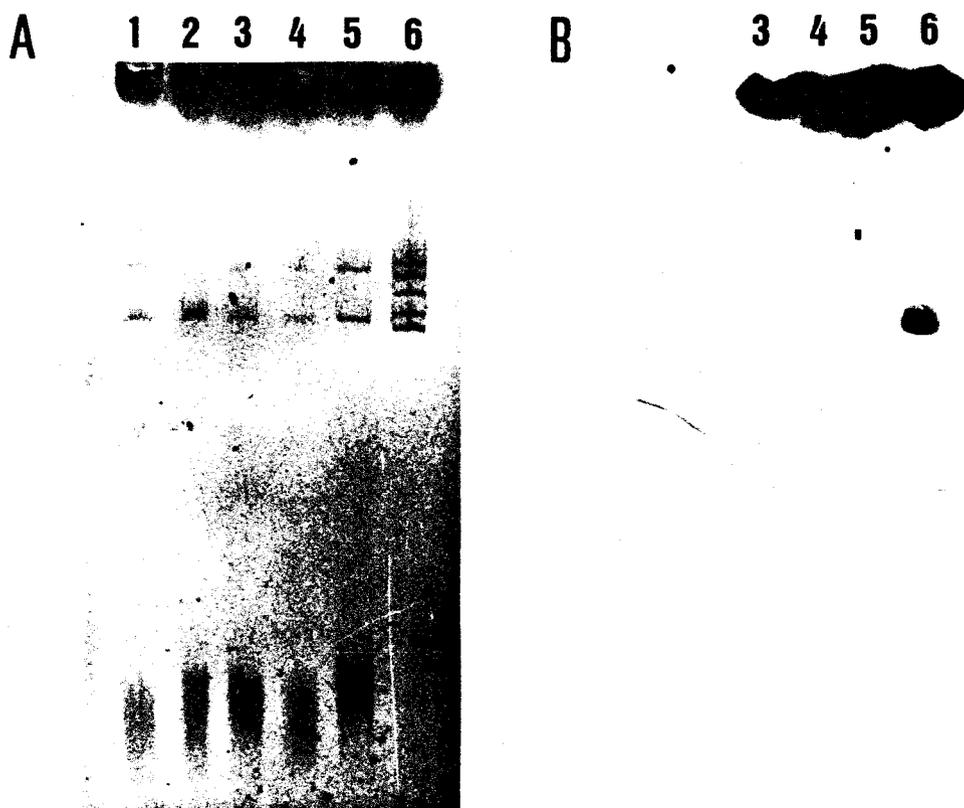


Figura 41.

A. Perfil de plásmidos que presentan las cepas CIAT899 (carril 1), RSP900 (carril 2), RSP9MJ (carril 3), RSP25MJ (carril 4), RSP36MJ (carril 5) y CFN037 (carril 5).

B. Autorradiografía obtenida tras la hibridación del filtro descrito en A, con la sonda *Tn5-mob*.

cepa CFN037, que presenta una inserción plasmídica de Tn5 (Soberón y col., 1990)

La autorradiografía de la hibridación se muestra en la Figura 41 B, pudiéndose observar que en todas las cepas RSP, la mutación aparece cromosómica.

3.3. Análisis de la mutación RSP25MJ.

Para poder aislar la mutación que afectaba a la cepa RSP25MJ, decidimos intentar su clonación en el vector pSK, a partir del ADN total de esta cepa, digerido con la endonucleasa *EcoRI*.

Todo el volumen de ligación fue transformado a HB101 y dos transformantes fueron seleccionados en medio LB kanamicina (resistencia conferida por Tn5::*mob*) ampicilina. Las concentraciones finales en el medio de cultivo de los antibióticos fueron de 100 mg/ml para la ampicilina y 25 mg/ml para la kanamicina.

El análisis de los transformantes confirmó el aislamiento del fragmento mutado (Figura 42).

3.4. Análisis de la mutación RSP36MJ.

3.4.1. Clonación de la mutación RSP36MJ.

La clonación del fragmento de ADN que lleva inserto el Tn5::*mob*, en la cepa RSP36MJ, se realizó en pSK a partir de ADN total digerido en *EcoRI*, como ha sido descrito para RSP25MJ.

Sólo un transformante creció en LB Km Amp (25, 100 mg/ml). El estudio por restricción del ADN plasmídico de este transformante, confirmó la presencia del fragmento que contiene el Tn5, pero reveló también la clonación de otro fragmento *EcoRI* de 3,2 kb (Figura 43 A).

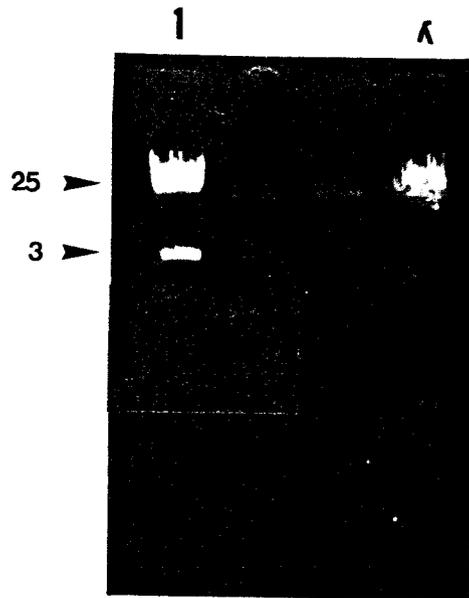


Figura 42.

Análisis por restricción del fragmento *EcoRI* que contiene a *Tn5-mob* de la cepa RSP25MJ, clonado en el vector pSK⁺.

3.4.2. análisis por restricción de los fragmentos *EcoRI* clonados.

Para el mapeo de la nueva construcción pMT536, se utilizaron las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Sma*I, así como sus combinaciones dobles.

En la Figura 43 B se muestra el mapa de restricción del plásmido pMT536 con las endonucleasas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Sma*I.

3.4.3. Número de copias del gen mutado.

Utilizando como sonda el fragmento de 13,65 kb de pMT536, se hibridó frente a los ADNs totales de las cepas RSP36MJ y CIAT899, digeridos con *Eco*RI

La aparición de dos bandas de hibridación que se observan en la Figura 44, tanto en la cepa silvestre como en RSP36MJ, indican la existencia de dos copias del gen mutado.

3.4.4. Hibridación frente a cósmidos de su grupo.

Dada que las insercciones de Tn5 en RSP35MJ y RSP36MJ aparecían en un mismo fragmento *Eco*RI, y que los cósmidos pMT35 y pMT36 que las complementaban, en su análisis por restricción, presentaban bandas comunes, quisimos comprobar mediante hibridación, si ambos cósmidos portaban la región interrumpida.

La sonda empleada para ésta hibridación frente a los cósmidos pMT35 y pMT36, digeridos con *Eco*RI+*Hind*III, fue el fragmento de 13,65 kb de pMT536. En la Figura 45, se muestra que pMT35 y pMT36 presentan una banda común de 3,4 kb que aloja el gen mutado.

3.5. Análisis de la mutación RSP9MJ.

3.5.1. Clonación de la mutación de RSP9MJ.

Para aislar la insercción de Tn5 en la cepa RSP9MJ se procedió de la misma forma que ya ha sido descrita en los apartados 3.3 y 3.4.

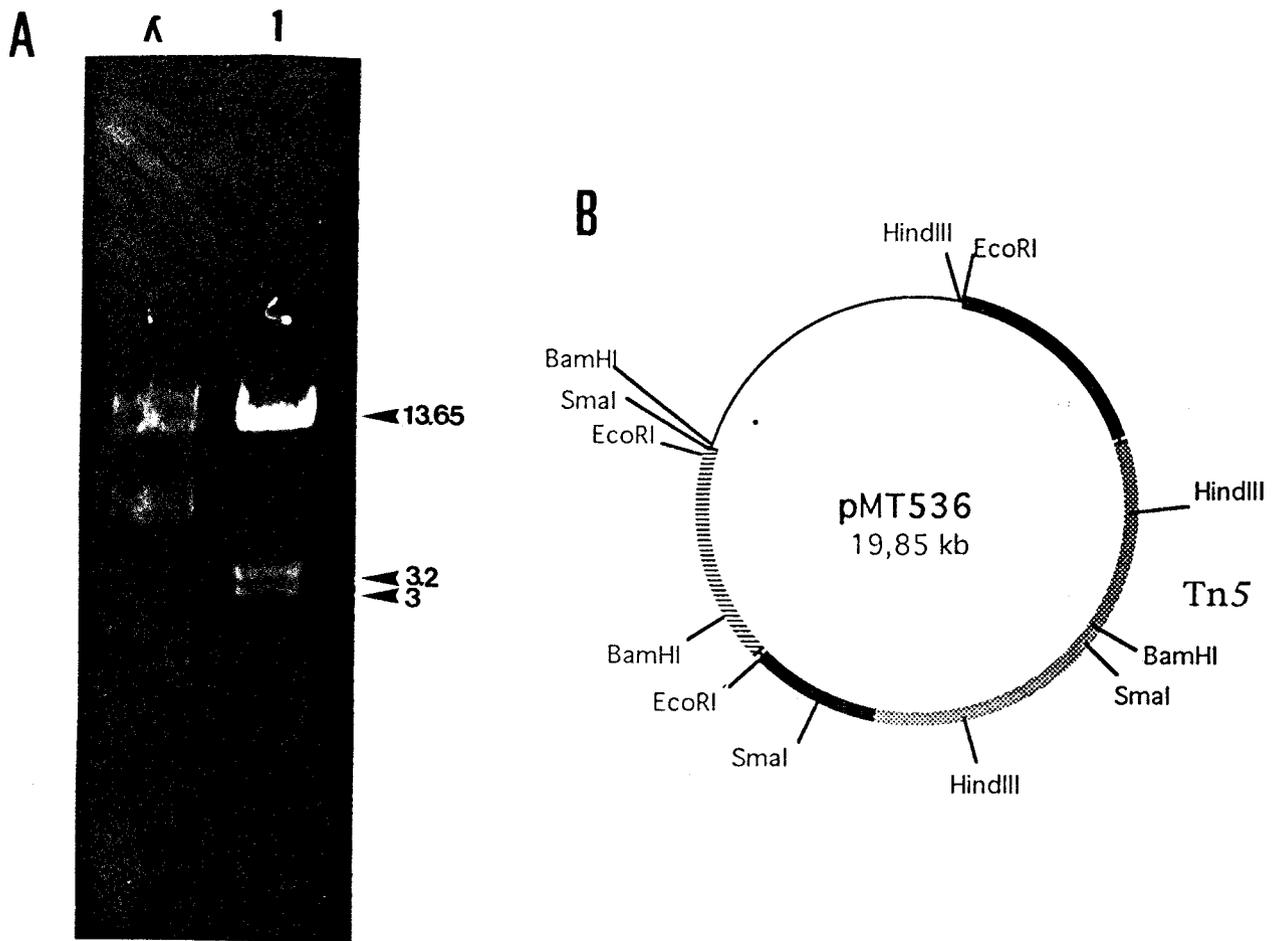


Figura 43.

A. Análisis por restricción de la clonación del fragmento de RSP36MJ que contiene a Tn5, en el vector pSK⁺ (plásmido pMT536).

B. Mapa de restricción de pMT536 con las endonucleasas: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Sma*I.

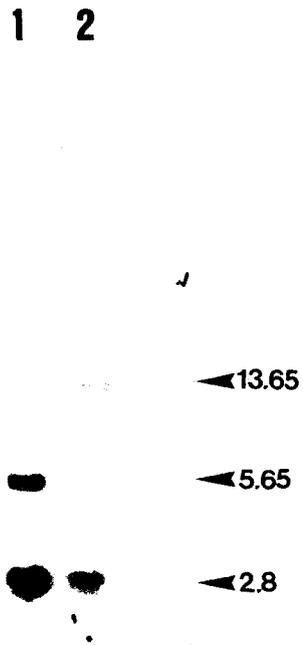


Figura 44.

Autorradiografía de la hibridación con el fragmento de 13,65 Kb *Eco*RI de pMT536, frente a los ADNs totales de CIAT899 (carril 1) y RSP36MJ (carril 2), digeridos con *Hind*III.

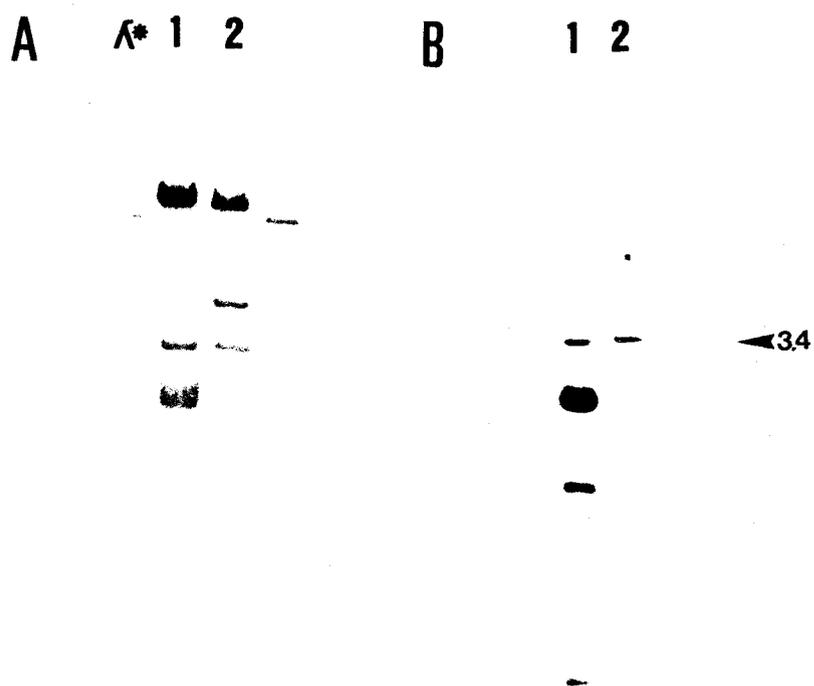


Figura 45.

A. Corte de los cósmidos pMT35 (carril 1) y pMT36 (carril 2) con las endonucleasas *EcoRI* + *HindIII*.

B. Autorradiografía del gel mostrado en A, tras la hibridación con la sonda de 13,65 Kb *EcoRI* de pMT536.

Se aislaron en LB Km Ap tres transformantes, que al ser analizados eran portadores del fragmento de 8,9 kb que contiene a Tn5::*mob* en RSP9MJ. El plásmido aislado se denominó pMT509.

3.5.2. Mapeo del fragmento clonado.

El plásmido pMT509 fue digerido con las endonucleasas de restricción *HindIII*, *EcoRI* y *HindIII+EcoRI*. En la Figura 46 se muestran las dianas con las endonucleasas *HindIII*, *EcoRI* y *EcoRV* encontradas.

3.5.3. Número de copias del gen mutado.

El fragmento de aproximadamente 9 kb *EcoRI* de la cepa RSP9MJ, clonado en pSK⁺, se utilizó como sonda de hibridación, para localizar en el genoma de CIAT899, el número de copias que presenta el gen mutado.

La hibridación frente a los ADNs totales de CIAT899 y RSP9MJ digeridos con *EcoRI*, dió una única señal en ambos carriles: de 900 pb en CIAT899 y como de 9 kb en RSP9MJ (Figura 47). Lo que indica la existencia de una única copia del gen mutado, que en la cepa silvestre se aloja en el fragmento *EcoRI* de 900pb.

3.5.4. Análisis por hibridación del fragmento aislado frente a cósmidos de su grupo.

Ya que los cósmidos pMT1, pMT9 y pMT21 podían complementar de forma cruzada las cepas RSP1, 9 y 21MJ, así como a aquellas otras cepas clasificadas en estas mutaciones; y que por otra parte, el cósmido pMT9 no contenía el fragmento mutado en RSP9MJ, decidimos ver si pMT1 o pMT21 alojaban al gen mutado.

En la Figura 48 A se muestra el gel con las digestiones de los cósmidos pMT1, pMT9, pMT21 y pMT25 con las endonucleasas *EcoRI*, *HindIII* y *EcoRI+HindIII*. y que se utilizó para la hibridación frente a la sonda de 400 pb *EcoRV-HincII* de pMT509.

En la Figura 48 B se observa que los cósmidos pMT1 y pMT21 contienen el fragmento de 900 pb *EcoRI*, mutado en RSP9MJ.

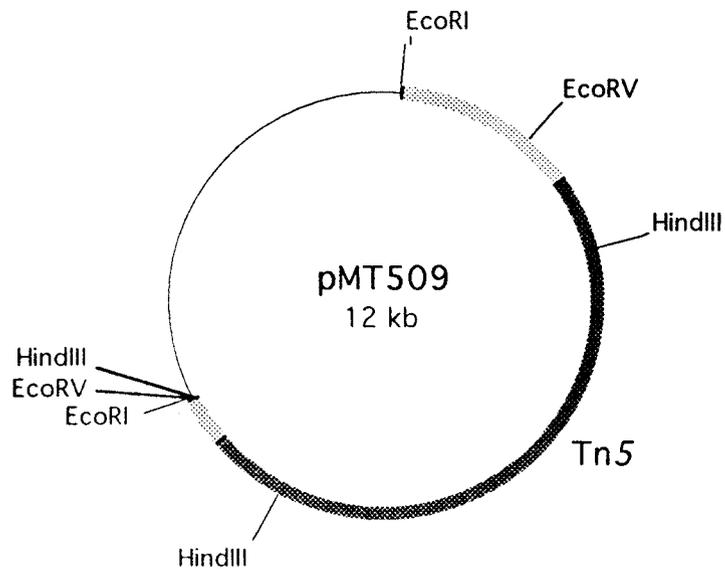


Figura 46. Mapa de restricción de pMT509 con las endonucleasas *EcoRI*, *EcoRV* y *HindIII*.

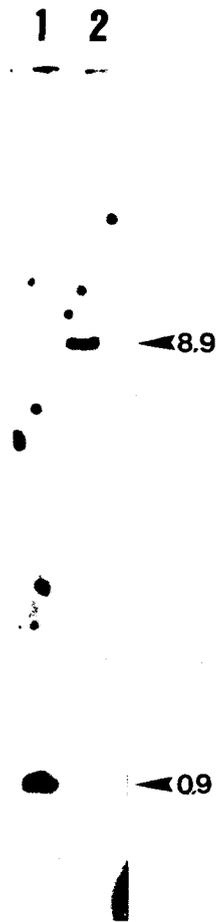


Figura 47.

Autorradiografía de la hibridación frente a la sonda de 8,9 Kb de pMT509, de los ADNs totales de CIAT899 (carril 1) y RSP9MJ (carril 2).

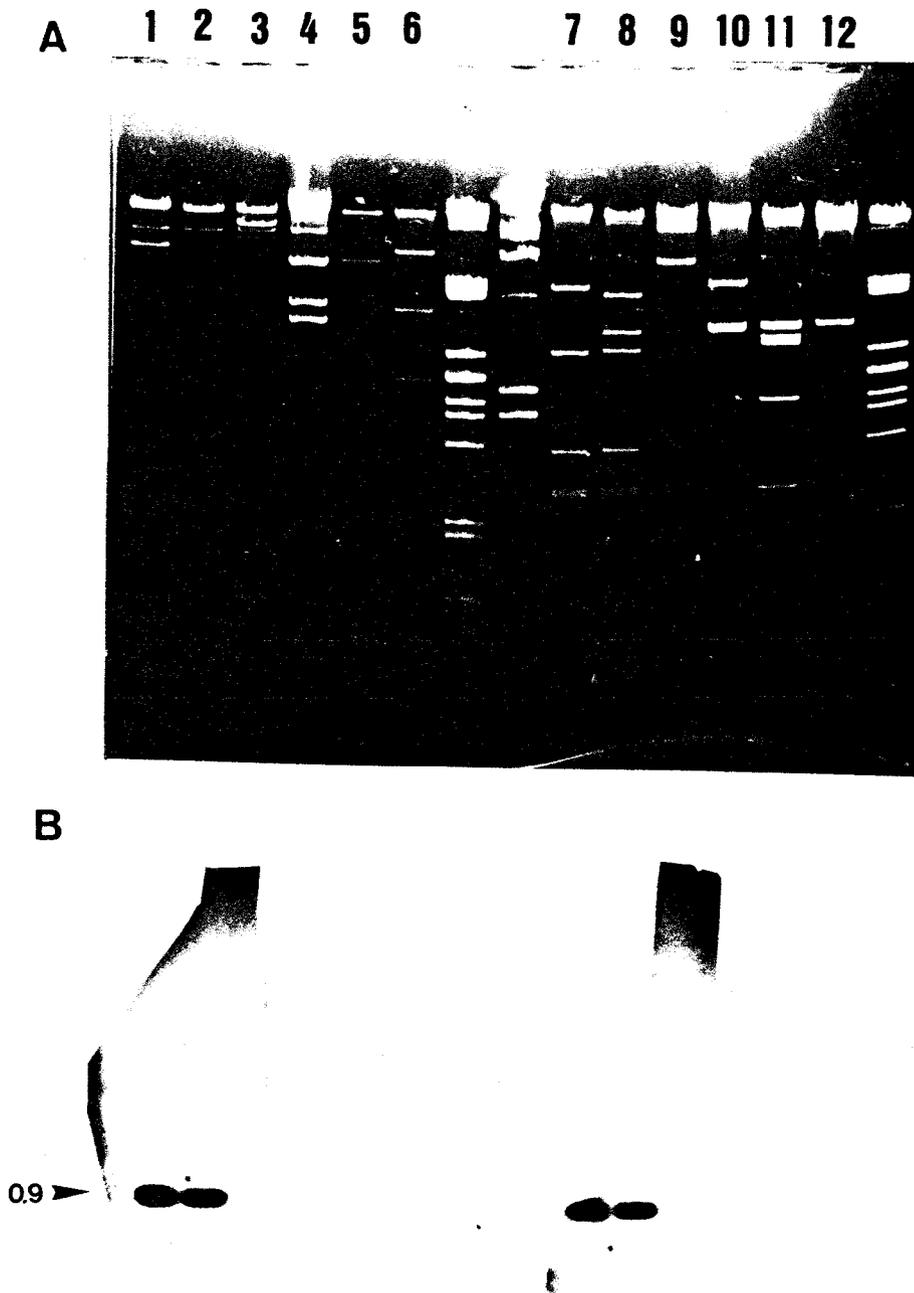


Figura 48.

A. Gel correspondiente a las digestiones de los cósmidos pMT1 (carriles 1, 2 y 3), pMT9 (carriles 4, 5 y 6), pMT21 (carriles 7, 8 y 9) y pMT25 (carriles 10, 11 y 12), con *EcoRI*, *HindIII* + *EcoRI*, y *HindIII*.

B. Autorradiografía de la hibridación frente al fragmento de 400 pb *EcoRV*-*HindII* de pMT509, del gel descrito en A.

3.5.5. Secuenciación de la mutación que afecta a RSP9MJ.

Para poder identificar el gen mutado en la cepa RSP9MJ, se decidió secuenciar el fragmento *EcoRI* del plásmido pMT509.

En la Figura 49 se recogen las subclonaciones realizadas a partir de pMT509, así como el sentido de la secuenciación en cada una de las subclonas.

Los nuevas construcciones en pSK⁺, fueron transformados a *E.coli* cepa DH5 α , y la selección de los transformantes fue en medio LB Ap IPTG X-gal, por su resistencia a ampicilina y coloración blanca de las colonias.

El ADN plasmídico extraído por gradiente de CsCl, fue secuenciado según el método enzimático descrito por Sanger, y siguiendo las instrucciones del Kit "Sequenase version 2.0".

La comparación de la secuencia obtenida de las 900 pb *EcoRI*, según el programa FASTA en GCG, detectó una alta homología con el gen *ilv D* de *E.coli* K-12 (Cox y col., 1987). *ilv D* forma parte del operón *ilv* GMEDA ya descrito en esta cepa de *E. coli*, y que interviene en la ruta biosintética de isoleucina, leucina, valina y ácido pantoténico (Figura 50).

3.5.6. Localización de genes de la ruta biosintética de isoleucina, valina, leucina y ácido pantoténico, en el genoma de *R. tropici* CIAT899.

Dada la alta homología encontrada entre nuestra secuencia del fragmento mutado en la cepa RSP9MJ, con el gen *ilvD* descrito en *E. coli*, decidimos comprobar si en *R. tropici* se conservaba la organización del operón.

Por datos de hibridación sabíamos que los cósmidos pMT1 y pMT21 contenían el fragmento de 900 pb *EcoRI* afectado por la mutación, y decidimos aislar de uno de los dos cósmidos un fragmento mayor de ADN que lo alojase. A partir del mapa de pMT21 y por hibridación (Figura 51),

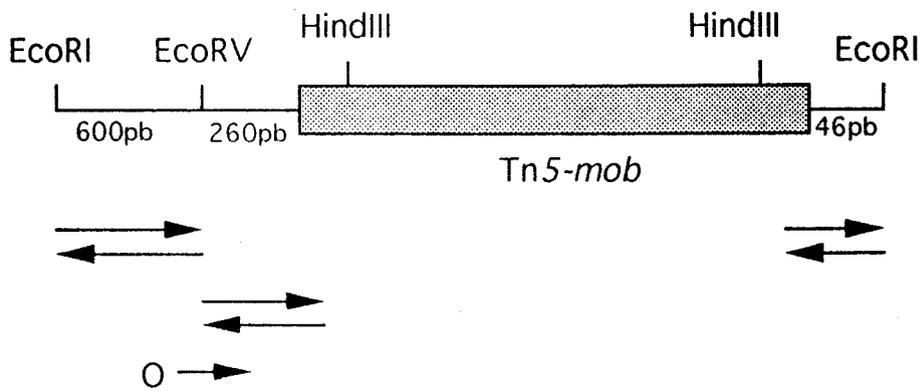


Figura 49.

Estrategia para la secuenciación de los extremos *EcoRI* adyacentes a *Tn5-mob*. Las líneas horizontales indican las subclonaciones realizadas en pSK, así como el sentido de la secuenciación. O: oligonucleótido de apoyo

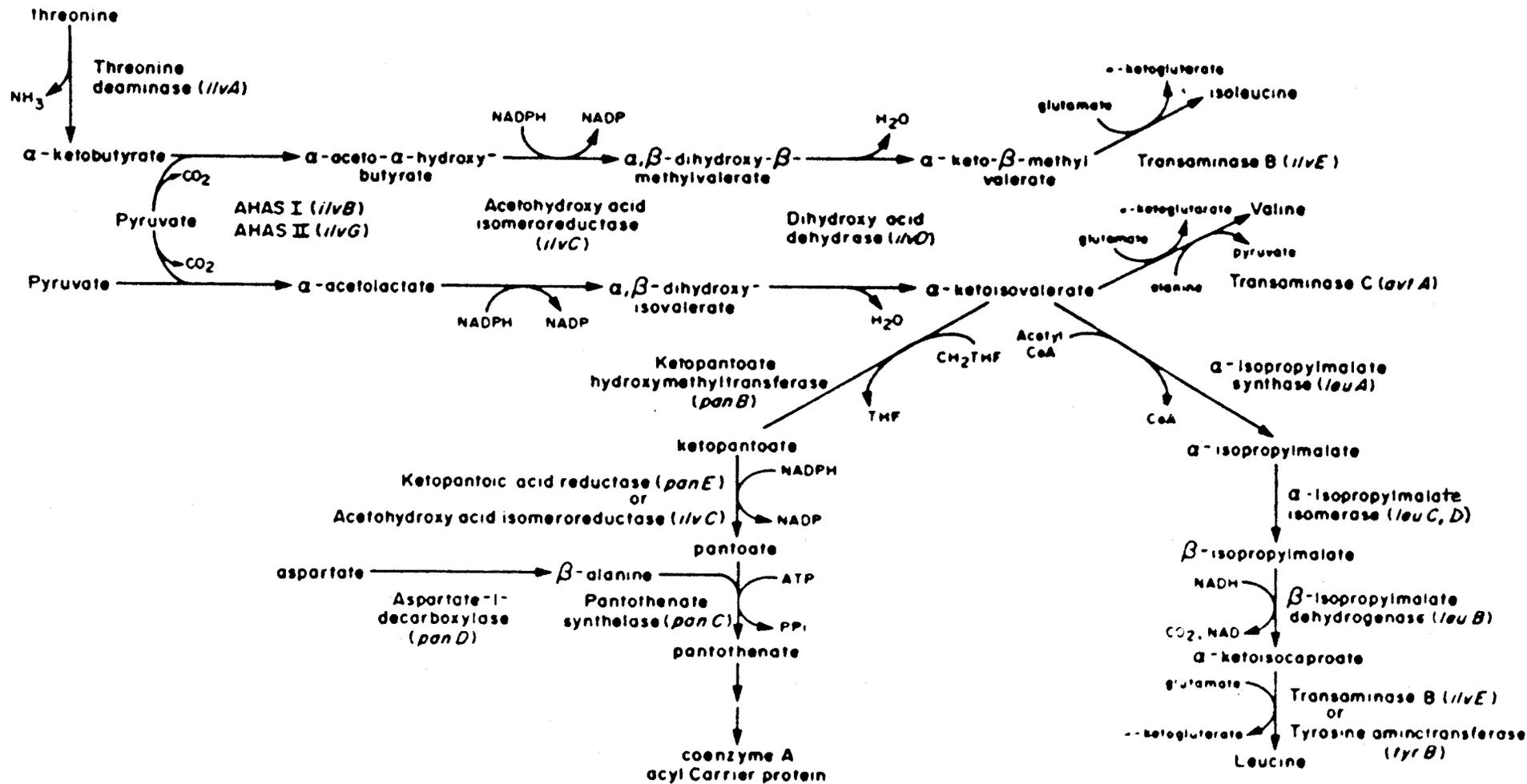


Figura 50.

Ruta biosintética de los aminoácidos ramificados y el ácido pantoténico (Primerano y Burns, 1983).

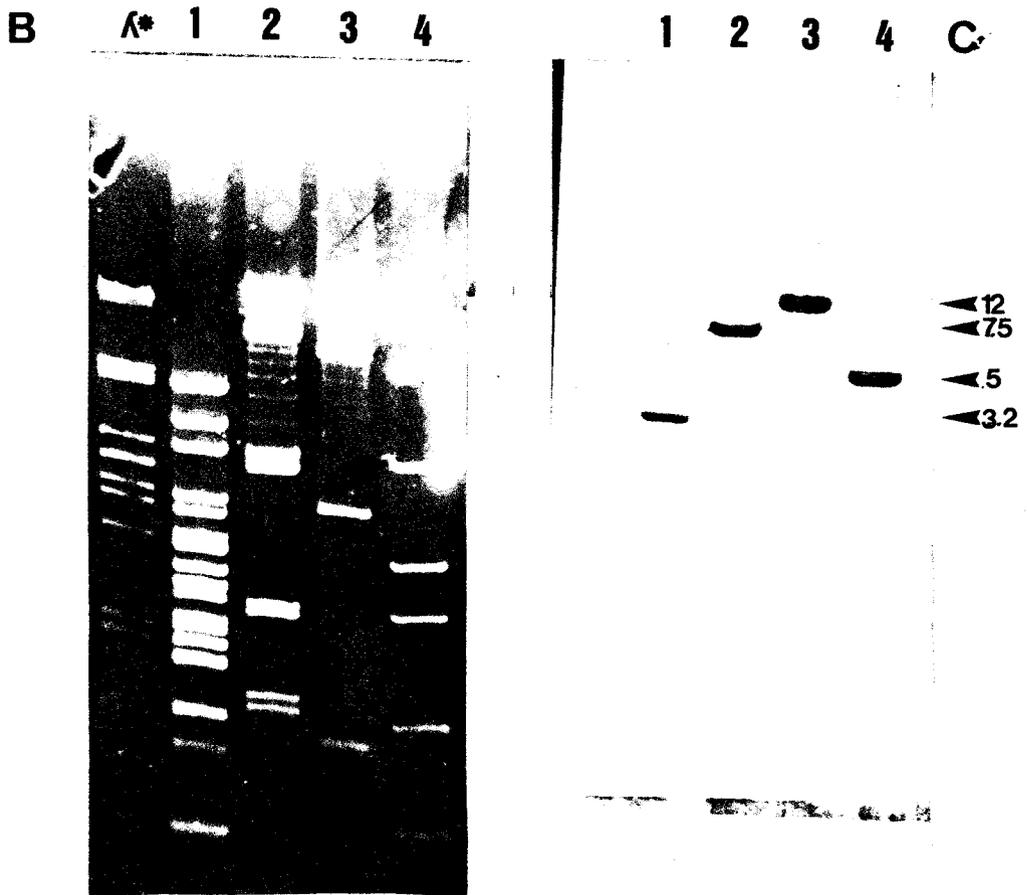
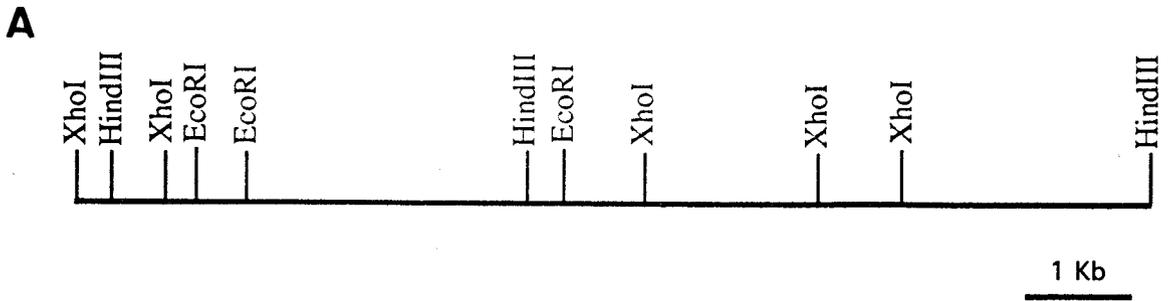


Figura 51.

A. Mapa de restricción del inserto *HindIII* del cósmido pMT21

B. Gel representativo de las digestiones de pMT21 con las endonucleasas *HindII* + *HindIII* (carril 1), *HindIII* + *PstI* (carril 2), *HindIII* + *SmaI* (carril 3) y *HindIII* + *XhoI* (carril 4).

C. Autorradiografía del gel descrito en B, frente a la sonda de 900 pb *EcoRI* de pMT21.

comprobamos que el gen mutado estaba presente en un fragmento de aproximadamente 7 Kb *Xho*I, el cual se pasó a subclonar en el vector pSK.

Los transformantes en *E. coli* DH5 α portadores de la nueva construcción pSMT217 fueron seleccionados por su crecimiento como colonias blancas en medio LB Ap IPTG X-gal.

En la Figura 52 se muestra el mapa de restricción del plásmido pSMT217 y la estrategia seguida para la secuenciación.

En la Figura 53 se muestra la secuencia nucleotídica obtenida. El alineamiento de la misma frente al operón *ilvGMEDA* de *E. coli* se hizo utilizando el programa FASTA del paquete GCG, y se muestra en la Figura 54.

De la secuencia y su alineamiento con el operón *ilvGMEDA* de *E. coli*, pudimos comprobar la presencia de los genes *ilvEDA*, situados contiguamente en el fragmento subclonado. Según la orientación de los genes y su localización en pMT21, se deduce que éste cósmido aloje sólo a estos tres genes; también creemos, por el tamaño del gen *ilvE* en *E. coli*, no se encuentre completo en pMT21, y sean los genes *ilvD* y *ilvA* los que estén complementando el fenotipo simbiótico de RSP9MJ.

De todos estos datos obtenidos respecto a la organización de los genes *ilv* en *R. tropici* se puede pensar, que la organización de los genes de la ruta biosintética de isoleucina-valina, se encuentre conservada entre las distintas especies bacterianas, como es el caso que aquí presentamos, e igualmente su mecanismo de regulación

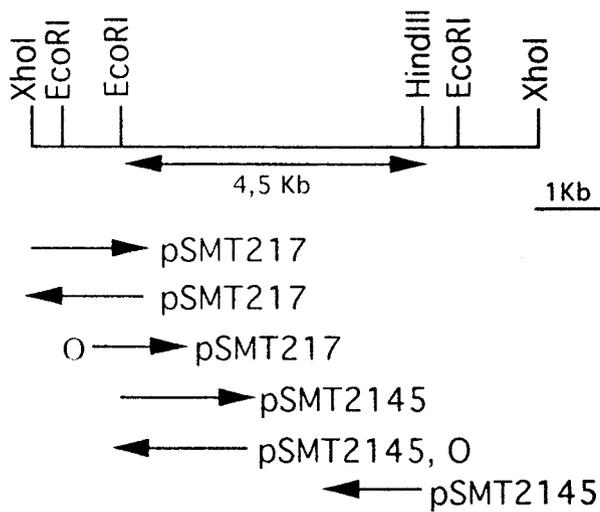


Figura 52.

Mapa de restricción de pSMT217 y estrategia de secuenciación. Las líneas horizontales indican el sentido de la secuenciación, y la subclonación de 4,5 Kb *EcoRI*-*HindIII* en pSK (pSMT2145); O, oligonucleótidos de apoyo.

Figura 53.

1 GTTATAGTGA CAGTACTGGA TGATTGGATT AGGACAATTC CAAAAAGCGG
51 AGTTGCCGGC CCCCTTTGG CCTGAAACCT TTGGCCCATG CCCGACGCCG
101 CGCAAATTCC AGGATGACGA GGAAGACACC ATGCCAGCTT ATCGTTCCAG
151 AACAACCACC CACGGCCGCA ACATGGCCGG CGCGCGCGCT TTGGCGTGCG
201 ACGGGTATGA AGGACAGCGA TTTCGGCAAG CCAATCATTG CGGTGGTCAA
251 TTCCTTACC CAGTTCTGTC CCGGCCACGT TCACCTCAAG GATCTCGGCC
301 AGCTCGTTGC CCGCGAAATC GAAGCTGCCG GCGCGTTGCC AAGGAATTCA
351 ACACCATCGC CGTCGATGAT GGTATCGCCA TGGGCCATGA CGGCATGCTT
401 TATTCGTTGC CATCACGCGA GCTGATCGCC GATAGCGTCG AGTATATGGT
451 CAATGCCCAT TGCGCCGACG CCATGGTCTG CATCTCCAAC TGCGACAAGA
501 TCACCCCCGG CATGCTGATG GCCTCGCTGC GCCTCAATAT CCCGACGGTC
551 TTCGTGTCCG GCGGCCCGAT GGAAGCCGGC AAGGTCGTTT TGCATGGCAA
601 GAAGGTCCGC CTCGACCTGG TCGATGCCAT GGTCGCCCGG GCTGACGACA
651 AGATCAGCGA CGAAGACGTC CAGGTCATCG AGCGCTCTGC CTGTCCGACC
701 TGCGGCTCGT GCTCGGGCAT GTTACC GCC AATTCGATGA ACTGCCTAAG
751 CTCCGCGAGC CAGACAGCGA CGGCCCGTTG CCGAGCTGCG AGCGGTGGGT
801 GCGGCTGGCG TTCGCGGAGA AGCAGCTTCG GCCGGTAGAC TAGCAGCTAG
851 AGCGGGCGGC AATGATGCTC GTCCTGCTAC CCTCCATCCT GCCGCGCTCC
901 GTTGCCCTCA AGCAGGCCCTT CGAGAACGCC ATGGCCCTCG ATATCGCCAT
951 GGGCGTTCGA CGAATACGGT TCTGCACATT CTGGCCGCCG CGCACGAAGG
1001 CGAAGTCGAT TTCACCATGG CCGACATCGA CGCGCTGTCT CGCCGCGTCC
1051 CGTGCCTGTC CAAGGTTGCG CCTGCCAAGA GCGACGTTCA CATGGAAGAC
1101 GTGCATCGCG CCGGCCGGCAT TATGTCGATC CTCGGCGAGC TCGATAAGGG
1151 CGGTCTCATC AACCGCGATT GCCCGACGGT TCATGCCGAA ACGCTCGGCG
1201 ACGCCATCGA CCGTTGGGAC ATCACCCGTA CCAACAGCGA AAGCGTACGC
1251 GAATTCTTCC GCGCGGCTCC GGGTGGCGTT CCGACGCAGG TTGCCTTCAG
1301 CCAGAGCTCC CGCTGGGATG AACTCGATAC GGACCGCGAG AAGGGCGTCA
1351 TCCGCTCCGT CGAGCATCCC TTTTCCAAGG ATGGCGGCCT GGCCGTCTCT
1401 AAAGGCAATC TGGCGCTTGA CCGCTGCATC GTGAAGACGG CCGGTGTCTGA

1451 TGAATCGATC CTGAAGTTCT CCGGCCCGGC CAAGGTCTTC GAAAGCCAGG
1501 ACGCTGCCGT CAAGGGCATC CTCAGCAGCG AAGTGAAGGC CGGCGACGTG
1551 GTCGTCATCC GATACGAAGG CCCAAAGCGG CCCCAGTATG CAGGAAATGC
1601 TCTATCCGAC GAGCTACCTG AAGTCGAAGG GCCTCGGCAA GGCTGCGCGC
1651 TGATCACAGA CGGCCGCTTC TCCGGCGGCA CCTCGGGCTT GTCGATCGGC
1701 CATGCTTCGT CCGGAAGCGC CAATGGCGGT ACGATCGTCT GGTGCGCGA

```

1 .....GTTATAGTGACAGTACTGGATGATTGGATTAGGACAATT 39
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3500 TACCAAACGCATTTCAGCAAGCCTTCTTCGGCCTCTTCACTGGCGAAACCG 3549
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
40  CCAAAAAGCGGAGTTGCCGGCCCCCCTTTGGCC.....TGAAAC 78
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3550 AAGATAAATGGGGCTGGTTAGATCAAGTTAATCAATAAATACAAAAAATG 3599
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
79  CTTTGGCCCATGCCCGACGCCGCGCAAATTCAGGATGACGAGGAAGACA 128
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3600 GGACGGCACGCACCGTCCCATTACGAGACAGACACTGGGAGTAAATAAA 3649
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
129 CCATGCCAGCTTATCGTTCCAGAACAACCACCCACGGCCGCAACATGGCC 178
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3650 GTATGCCTAAGTACCGTTCCGCCACCACCACTCATGGTCGTAATATGGCG 3699
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
179 G..GCGCGCGCGCTTTGGCGTGCGACGGGTATGAAGGACAGCGATTTCCGG 226
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3700 GGTGCTCGTGCGCTGTGGCGGCCACCGGAATGACCGACGCCGATTTCCGG 3749
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
227 CAAGCCAATCATTGCGGTGGTCAATTCCTTCACCCAGTTCGTGCCCGGCC 276
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3750 TAAGCCGATTATCGCGGTTGTGAACTCGTTCACCCAATTTGTACCGGGTC 3799
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
277 ACGTTCACCTCAAGGATCTCGGCCAGCTCGTTGCCCGCGAAATCGAAGCT 326
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3800 ACGTCCATCTGCGCGATCTCGGTAAACTGGTGC CGGAACAAATTGAAGCG 3849
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
327 GCCGGC.GCGTTGCCAAGGAATTCAACACCATCGCCGTCGATGATGGTAT 375
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3850 GCTGGCGGGCGTTGCCAAAGAGTTCAACACCATTGCGGTGGATGATGGGAT 3899
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
376 CGCCATGGGCCATGACGGCATGCTTTATTTCGTTGCCATCAGCGAGCTGA 425
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3900 TGCCATGGGCCACGGGGGATGCTTTATTCACTGCCATCTCGCGAACTGA 3949
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
426 TCGCCGATAGCGTGCAGTATATGGTCAATGCCATTGCGCCGACGCCATG 475
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3950 TCGCTGATTCCGTTGAGTATATGGTCAACGCCCACTGCGCCGACGCCATG 3999
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
476 GTCTGCATCTCCAAC TGCGACAAGATCACCCCGGCATGCTGATGGCCTC 525
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4000 GTCTGCATCTCTAACTGCGACAAAATCACCCCGGGGATGCTGATGGCTTC 4049
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
526 GCTGCGCCTCAATATCCCGACGGTCTTCGTGTCCGGCGGCCCGATGGAAG 575
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4050 CCTGCGCCTGAATATTCCGGTGATCTTTGTTTCCGGCGGCCCGATGGAGG 4099
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
576 CCGGCAAGGTCGTTCTGCATGGCAAGAAGGTCGCCCTCGACCTGGTCGAT 625
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4100 CCGGGAAAACCAAAC TCCGATCAGATCATCAAGCTCGATCCGGTTGAT 4149
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
626 GCCATGGTCGCCGCGGCTGACGACAAGATCAGCGACGAAGACGTCCAGGT 675
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4150 GCGATGATCCAGGGCGCAGACCCGAAAGTATCTGACTCCAGAGCGATCA 4199
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
676 CATCGAGCGCTCTGCCTGTCGACCTGCGGCTCGTGCTCGGGCATGTTCA 725
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4200 GGTGGAACGTTCCGCGTGTCCGACCTGCGGTTCTTGCTCCGGGATGTTA 4249

```


4. CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS Y SIMBIÓTICAS DE RSP9MJ

4.1. Características fisiológicas.

4.1.1. Crecimiento en medio mínimo y auxotrofia.

Tras el alto porcentaje de homología encontrado entre la secuencia de ADN mutado en RSP9MJ y el gen *ilvD* en *E. coli*, que interviene en la ruta biosintética de isoleucina, leucina, valina y ácido pantoténico, fue posible conocer algo más acerca de los requerimientos nutricionales de esta mutación.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha comprobado el distinto comportamiento de la cepa RSP9MJ en función del medio de cultivo en que se crezca y en todos los casos su requerimiento nutricional se ve superado con la adición de cantidades mínimas de casaminoácidos (0,05%).

Decidimos entonces comprobar que las deficiencias que presentaba la cepa eran causadas por la interrupción en la ruta de síntesis de los aminoácidos: isoleucina, valina y leucina; así como de ácido pantoténico. Para ello, RSP9MJ se creció en medio mínimo M9, y M9 adicionado de los aminoácidos anteriormente mencionados, y de la vitamina, en distintas combinaciones (Tabla 11). Solo la adición de los cuatro compuestos, permitió un crecimiento análogo al de la cepa silvestre.

Tabla 11. Crecimiento presentado por las cepas CIAT899 y RSP9MJ en medio mínimo y adicionado.

	M9 18h-24h	M9a 18h-24h	M9b 18h-24h	M9c 18h-24h
CIAT899	+ +	+ +	+ +	+ +
RSP9MJ	- -	- -	- -	+ +

-
- a: Adición de valina y leucina
 - b: Adición de valina, leucina y ácido pantoténico.
 - c: Adición de isoleucina, valina, leucina y ácido pantoténico.
 - +: Crecimiento. presentado por la cepa silvestre.
 - : No se observó ningún crecimiento.

Tras estos resultados, quisimos comprobar que la complementación con pMT21, que corregía el defecto simbiótico de RSP9MJ, también lo hacía de la auxotrofia. Se intento paralelamente una segunda complementación con la región de pMT21 que contenía a los genes *ilvD* y *ilvA* (datos comprobados por secuenciación, ver punto III. E. 6) afectados en la mutación de RSP9MJ. La construcción del cósmido pMT2102, portador del fragmento de 5,7 kb *XhoI-HindIII* (*ilvD*, *ilvA*) de pMT21 en pVK102, se muestra en la Figura 55.

Las complementaciones de RSP9MJ con pMT21 y pMT2102 se hicieron siguiendo la técnica de conjugación triparental, con la ayuda del plásmido cooperador pRK2013. Los transconjugantes fueron seleccionados en medio TY Km Tc Rf.

Los transconjugantes obtenidos, fueron crecidos en medios con agar: M9, y M9 adicionado de isoleucina, leucina, valina y ácido pantoténico. Todos los transconjugantes ensayados presentaban igual crecimiento en ambos medios.

Se realizó un seguimiento del crecimiento de las cepas CIAT899, RSP9MJ, RSP9MJ (pMT21) y RSP9MJ (pMT2102). Los medios de cultivo empleados fueron M9 con y sin los suplementos nutricionales ensayados anteriormente, y a las mismas concentraciones finales. La única diferencia en el medio usado fue la sustitución de la fuente de nitrógeno: NH_4Cl por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En la Figura 56 se muestran los resultados del crecimiento de las cepas, después de un seguimiento de 48 horas en los medios de cultivo anteriormente mencionados. Es curioso observar, que la cepa RSP9MJ presenta una inhibición de su crecimiento en este medio.

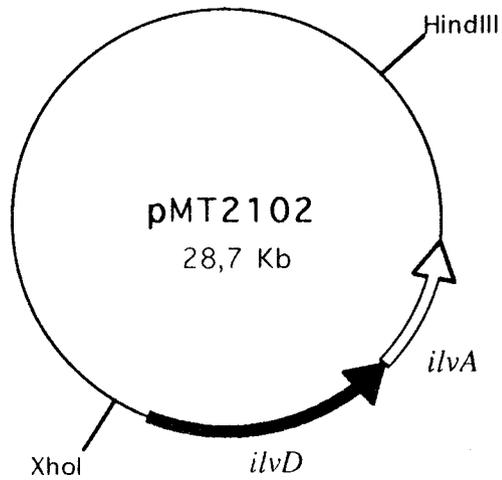


Figura55.
Cósmido pMT2102, construido en pVK102 y portador de los genes *ilvD*, *ilvA* de *R. tropici* CIAT899.

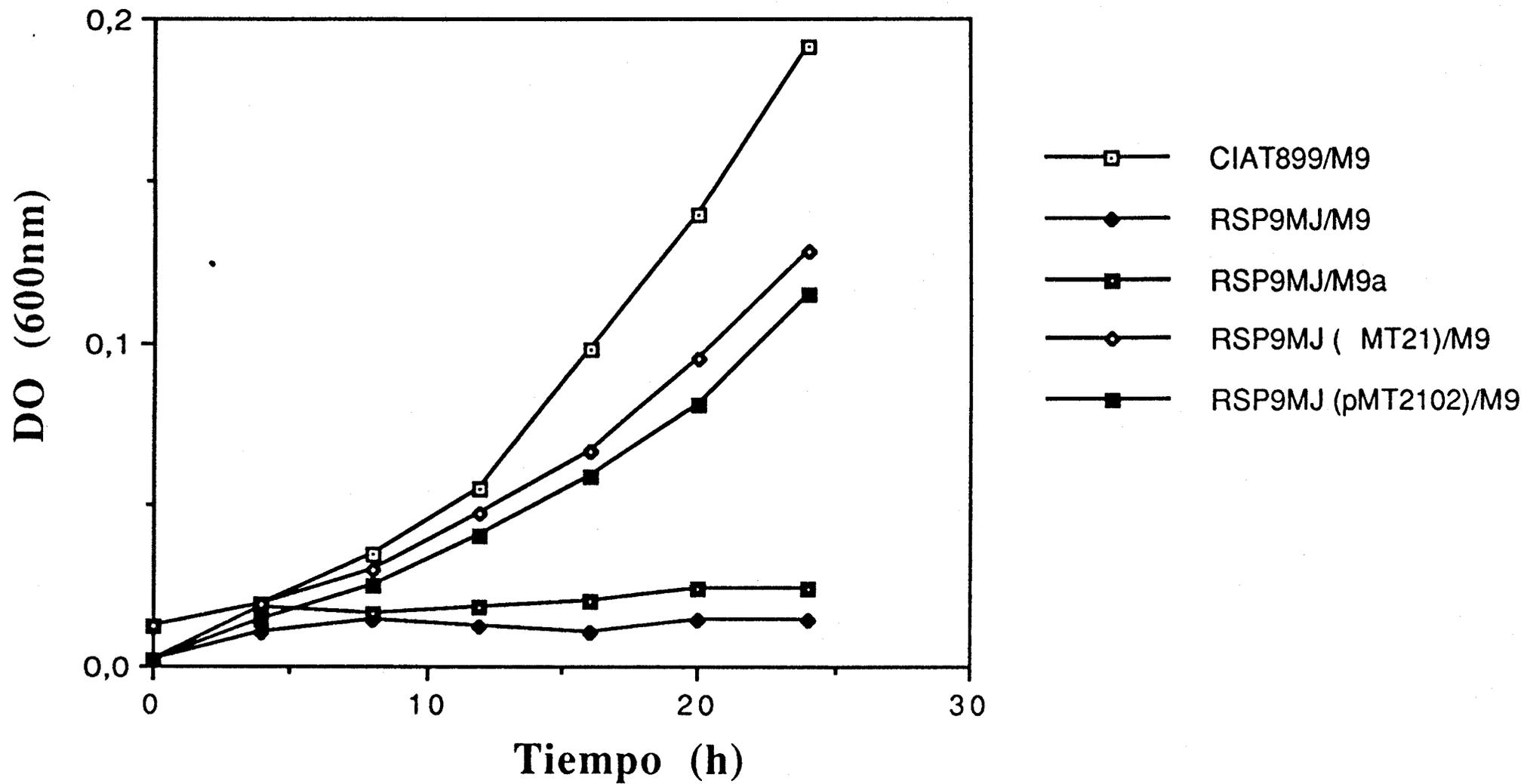


Figura 56.

Estudio del crecimiento presentado por las cepas: CIAT899, RSP9MJ, RSP9MJ (pMT21) y RSP9MJ (pMT2102).

4.1. 2. Producción y tipo de exopolisacárido.

La cepa RSP9MJ produce distintas cantidades de EPS según el medio usado: YEM o ALLEN, pero en ambos casos es menor que la producida por CIAT899 . En cuanto a la composición del EPS, sólo se observan ligeras diferencias entre ambas cepas (M.J. Romero. T. Licenciatura. Universidad de Sevilla).

4.2. Características simbióticas.

El fenotipo simbiótico inducido en plantas de frijol por RSP9MJ es de nódulos con una morfología similar a los inducidos por la cepa silvestre, pero con una coloración blanca (Figura 20), sin embargo no son nódulos vacíos como se comprobó por microscopía.

Las medidas de fijación de nitrógeno por ensayos de reducción de acetileno, demostraron que se trata de nódulos que carecen de actividad nitrogenasa.

V. BIBLIOGRAFIA

Aba, M., Amemura, M., y Higashi, A. 1982. Studies on cyclic b-(1,2)-glucan obtained from the periplasmic space of *R.trifolii* cells. *Plant Soil* 64: 315-324.

Aguilar, O.M.y.G., D.H. 1991. The product of the *R.meliloti* *ilv C* gene is required for isoleucine and valine synthesis and nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* 173: 7756-7764.

Amemura, A. 1984. Synthesis of (1,2)-beta-D-glucan by cell-free extracts of *A.radiobacter* IFO 12665b1 and *R.phaseoli* AHU 1133. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1809-1817.

Appelbaum, E.R.y.c. 1988. *J. Bacteriol.* 170: 12-20.

Atkins, C.A. 1987. Metabolism and traslocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. *Plant Soil* 100: 157-169.

Averyhart-Fullard, V., Datta, K. y Marcus, A. 1988. A hydroxyproline-rich protein in the cell wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1083-1085.

Baev, N., Endre, G., Petrovies, G., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. 1991. Six nodulation genes of *nod box* locus-4 in *R.meliloti* are involved in nodulation signal production--*nod M* codes for D-glucosamina synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 228: 113-124.

Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I. y Kondorosi, A. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on high molecular weight plasmid of *R.meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184: 318-325.

Barbour, W.M., Wang, S.P. y Stacey, G. 1992. Molecular genetics of *Bradyrhizobium* symbiosis. En: *Biological Nitrogen Fixation*. New York. Chapman y Hall. 654-681.

Barnett, M.J.y.L., S.R. 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: *Syr M* has sequence similarity to *Nod D* proteins. *J. Bacteriol.* 172: 3695-3700.

- Barsomiam, G.D., Urzainki, A., Lohman, K. y Walker, G.C. 1992. *R.meliloti* mutants unable to synthesize anthranilate display a novel symbiotic phenotype. *J. Bacteriol.* 174: 4416-4426.
- Batley, M., Redmond, J.W., Djordjevic, S.P. y Rolfe, B.G. 1987. Characterization of glycerophosphorylated ciclid b-1,2-glucans from a fast growing *Rhizobium* species. *Biochim. Biophys. Acta* 901: 119-126.
- Becker, A., Kleickmann, A., Arnold, W. y Pühler, A. 1993. Analysis of the *R. meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: *ExoK* shows homology to excreted b-1,3-1,4-glucanases and *ExoH* resembles membrane proteins. *Mol. Gen. Genet.* 238: 145-154.
- Beringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:
- Bhagwat, A.A., Tully, R.E. y Keister, D.L. 1992a. Isolation and characterization of an *ndv B* locus from *R.fredii*. *Mol. Microbiol.* 6: 2159-2165.
- Bhagwat, A.A.y.K., D.L. 1992b. Synthesis of b-glucans by *B.japonicum* and *R.meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 38: 510-514.
- Bhat, U.R., Mayer, H., Yokota, A., Hollinsworth, R.I. y Carlson R.W. 1991. Ocurrance of lipid A variants with 27-hydroxioctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family Rhizobiaceae. *J. Bacteriol.* 173: 2155-2159.
- Bhuvaneswari, T.V., Bhagwat, A.A. y Bauer, W.D. 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) by *R. japonicum*. *Plant Physiol.* 66: 1027-1031.
- Bhuvaneswari, T.V., Bhagwat, A.A. y Bauer, W.D. 1981. Transsient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol.* 68: 1144-1149.
- Bhuvaneswari, T.V.y.S., B. 1985. Root hair deformation in the white clover-*R.trifolii* symbiosis. *Physiol. Plant.* 63: 25-34.

Bibb, M.J., Biro, S., Motamedi, H., Collins, J.F. y Hutchinson, C.R. 1989. Analysis of the nucleotide sequence of the *S.glaucescens* *tcm 1* genes provide key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. *EMBO J.* 9: 2727-2736.

Bohin, J.P.y.K., E.P. 1984. Mapping of a locus (*mdo A*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *E.coli*. *J. Bacteriol.* 157: 956-957.

Borthakur, D.y.c. 1985. *Mol. Gen. Genet.* 200: 278-282.

Borthakur, D.y.J., A.W.B. 1987. *Mol. Gen. Genet.* 207: 149-154.

Borthakur, D., Barker, R.F., Latchford, J.W., Rossen, L. y Johnstson, A.W.B. 1988. Analysis of *pss* genes of *R.leguminosarum* required for exopolysaccharide synthesis aand nodulation of peas: Their primary structure and interaction with *psi* and other nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 213: 155-162.

Boyer, H.S.y.R.-D., D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.

Breedveld, M.W., Zevenhuijen, L.P.T.M. y Zehnder, A.J.B. 1990. Excessive excretion of cyclic b-(1,2)-glucan by *R.trifolii* TA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2080-2086.

Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M. y Zehnder, A.J.B. 1992. Synthesis of cyclic b-(1,2)-glucan by *R.leguminisarum*. *bv.trifolii* TA-1: factors influencing excretion. *J. Bacteriol.* 174: 6336-6342.

Brink, B.A., Miller, J., Carlson, R.W., y Noel, K.D. 1990. Expression of *R.leguminosarum* CFN42 genes for lipopolisaccharidein strains derived from different *R.leguminosarum* soil isolates. *J. Bacteriol.* 172: 548.

Bromfield, E.S.P.y.B., L.R. 1990. Promiscuous nodulation of *P.vulgaris*, *M.atropurpureum* and *L.leucaccephala* by indigenous *R.meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 36: 369-372.

Broughton, W.J., Krause, A., Lewin, A., Perret, X., Prica, N.P.J., Relic, B., Rochepeau, P., Wong, C.H., Peuppke, S.G. y Benner, S. 1990. Signal exchange mediates host-specific nodulation of tropical legumes by the broad host-range *Rhizobium* species NGR234. En: *Advances in molecular genetics of plant microbe interactions*, vol.1. Hennecke y Verma (eds.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. 162-167.

Brzoska, P.M.y.S., E.R. 1991. *lps Z*, a lipopolysaccharide gene involved in symbiosis of *R.meliloti*. *J. Bacteriol.* 173: 3235-3237.

Bulawa, C.E. 1991. Chitin and nodulation. *Nature* 353: 710.

Burn, J.E., Hamilton, W.D., Wootton, J.C. y Johnston, A.W.B. 1989. Single and multiple mutations affecting properties of the regulatory gene *nod D* of *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* 3: 1567-1577.

Caetano-Anollés, G., Lageres, A. y Bauer, W.D. 1990. *R.meliloti* exopolysaccharide mutants elicit feedback regulation of nodule formation in alfalfa. *Plant Physiol.* 91: 368-374.

Cangelosi, G.A., Hung, L. Puvaneserajah, V., Stacey, G., Ozga, D.A., Leigh, J.A. y Nester, E.W. 1987. Common loci for *A.tumefaciens* and *R.meliloti* exopolysaccharides synthesis and their roles in plant interactions. *J. Bacteriol.* 169: 2086-2091.

Canters Cremers, H.C.J., Spaink, H.P., Wijfjes, A.H.M. y col. 1989. Additional nodulation genes on the *Sym* plasmid of *R.leguminosarum* bv. *viciae*. *Plant. Mol. Biol.* 13: 163-174.

Carlson, R.W., y Lee, R.P.A. 1983. A comparison of the surface polysaccharides from *R.leguminosarum* 128C53 str rif with the surface polysaccharides from its Exo mutant. *Plant Physiol.* 71: 223.

Carlson, R.W. 1984. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 158: 1012-1017.

Carlson, R.W., Garcia, F., Noel, K.D. y Hollingsworth, R. 1989. The structures of the lipopolysaccharide core components from

R.leguminosarum bv. *phaseoli* CE3 and of two of its symbiotics mutants, CE109 and CE309. *Carbohydr. Res.* 195: 101-110.

Carlson, R.W., Bhat, U.R. y Reush, B. 1991. Rhizobium lipopolysaccharides: Their structure and evidence for their importance in the nitrogen-fixing symbiotic infection of their host legumes. En: *Current Topics in Plant Molecular Biology*. Volumen 1. Gresshoff, P.M. (ed.). Chapman and Hall. New York. London. 39-50.

Carlson, R.W., Kalembara, S., Turowski, D., Pachori, P. y Noel, K.D. 1987. Characterization of the lipopolysaccharide from a mutant that is defective in infection thread development. *J. Bacteriol.* 169: 4923-4928.

Carrion, M., Bhat, U.R., Reuhs, B. y Carlson, R.W. 1990. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 172: 1725.

Casadesús, J.y.O., J. 1979. Rough and fine linkage mapping of the *R.meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 174: 203-209.

Cava, J.R., Elías, P.M., Turowaki, D.A., y Noel, K.D. 1989. *R.leguminosarum* CFN42 genetics region encoding lipopolisaccharide structures essential for complete nodule development on beans plants. *J. Bacteriol.* 171:

Cava, J.R., Tao, H., y Noel, K.D. 1990. Mapping of complementation groups within a *R.leguminosarum* CFN42 chromosomal region required for lipopolisaccharide synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 221: 125.

Chen, H., Batley, M., Redmond, J. y Rolfe, B.J. 1985. Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range *Rhizobium* due to changes in exopolysaccharide synthesis. *J. Plant. Physiol.* 120: 331.

Chen, H.y.R., B.J. 1987. Cooperativity between *Rhizobium* mutants atrains: Induction of nitrogen-fixing nodules on the tropical legume *L.leucocephala*. *J. Plant. Physiol.* 127: 307.

Chkravorty, A.K., Zurkowzki, W., Shine, J. y Rolfe, B.J. 1982. Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of *Rhizobium* genes involved in exopolysaccharide synthesis and effective nodulation. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 585.

Clover, R., Kieber, J. y Signer, E.R. 1989. Lipopolisaccharide mutant of *R.meliloti* are not defective in symbiosis. *J. Bacteriol.* 171: 3961.

Cohen, J.L.y.M., K.J. 1991. A novel membrane-bound glucosyltransferase from *B.japonicum* . *J. Bacteriol.* 173: 4271-4276.

Coronado, C., Megías, M., Ruíz-Berraquero, F. y Palomares, A.J. 1989. Interspecies homology of nodule development genes in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 59: 289-296.

Corzo, J., Pérez-Galdona, R., León-Barrios, M. y Gutierrez-Navarro, A.M. 1991. Alcian blue fixation allows silver staining of the isolated polysaccharide component of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 12: 439-441.

Cox, J.L., Cox, B.J., Fidanza, V. y Calhoun, D.H. 1987. The complete nucleotide sequence of the *ilvGMEDA* cluster of *E. coli* K-12. *Gene* 56: 185-198.

Davis, E.O., Evans, I.J. y Johnston, A.W.B. 1988. Identification of nod X, a gene that allows *R.leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM to nodulate Afganistan peas. *Mol.Gen. Genet.* 212: 531-535.

Dazzo, F.B.y.T., G. 1983. Interaccion of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium* -legume symbiosis. *J.Membr.Biol.* 73: 1-16.

Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Hollinsworth, R.I., Hrabak, E.M., Pankrazt, H.T., Phillip-Hollingsworth, S., Salzwedel, J.L., Chapman ,K., Appenzaller, L., Squartini, A., Gerhold, D. y Orgambide, G. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharides modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.* 173: 5371-5384.

de Bruijn, F.J., Rossbach, S., Schneider, M., Ratet, P., Messmer, S., Szeto, W.W., Ausubel, F.M. y Schell, J. 1989. *R.meliloti* 1021has three

differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171: 1673-1682.

de Bruijn, F.J., Szabados, L. y Schell, J. 1990. Chimeric genes and transgenic plants to study the regulation of genes involved in symbiotic plant-microbe interactions (nodulin genes). *Dev. Genet.* 11: 182-196.

De Maagd, R.A., Wijfjes, A.H.M., Spaink, H.P., Ruiz-Sainz, J.R., Wijffelman, C.A., y col. 1990. nod O, a new nod gene of the *R.leguminosarum* bv. *viciae* Sym plasmid encodes a secreted protein. *J. Bacteriol.* 171: 6764-6770.

de Maagd, R.A., Rao, A.S. y col. 1989. Isolation and characterization of mutants of *R.leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible roles of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.* 171: 1143.

de Vos, G.F., Walker, G.C. y Signer, E.R. 1986. Genetic manipulations in *R.meliloti* utilizing two new transposon Tn5 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 204: 485-491.

Debellé, F., Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martínez, E y col. 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *R.meliloti*. *J. Bacteriol.* 168: 1075-1086.

Debellé, F., S.B. 1986. Nucleotide sequence of *R.meliloti* RCR2011 genes involved in host specificity of nodulation. *Nucleic Acid Res.* 14: 7453-7472.

Debellé, F., Maillet, F., Vasse, J., Rosenberg, C., De Billy, F., y col. 1988. *J. Bacteriol.* 170: 5718-5727.

Delwiche, C.C. 1977. Energy relations in the global nitrogen cycle. *Ambio.* 6: 106-11.

Demont, N., Debellé, F., Aurelle, H., Denarié, J., y Promé, J.C. 1993. Role of the *R.meliloti* nod F y nod E genes in the biosynthesis of lipo-

ologosaccharic nodulation factors. *The Journal of Biol. Chemistry.* 268: 20134-20142.

Dénarié, J.y.C., J. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulations factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74: 951-954.

Dénarié, J., Debelle, F., Truchet, G. y Prome, J.C. 1993. Rhizobium and legume nodulation: a molecular dialogue. En: *New Horizons in Nitrogen Fixation.* Palacio y col. (eds). Kluwer Academic Publishers.

Dickstein, R., Bisseling, T., Reinhold, V.N. y Ausubel, F.M. 1988. Expression of nodule specific genes in alfalfa roots nodules blocked at an early stage of development. *Genes and Develop.* 2: 677-687.

Diebold, R.y.N., K.D. 1989. R.leguminosarum exopolisaccharide mutants: biochemical and genetics analyses and symbiotic behavior on three hosts. *J. Bacteriol.* 171: 4281.

Ditta, G., Standfield, S., Corbin, D. y Helinski, D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria : construction of a gene bank of R. meliloti. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347-7351.

Ditta, G.S., Schmidhauser, T., Yacobson, E., Lu, P., Liang, X.W., Finlay, D.R., Guiney, D. y Helinski, D.R. 1985. Plasmid related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and monitoring gene expresion. *Plasmid* 13: 149-153.

Díaz, C.L., Melchers, L.S., Hooykaas, P.J.J., Lugtemberg, B.J.J. y Kijne, J.W. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant especificity in the Rhizobium -legume symbiosis. *Nature* 338: 579-581.

Djordjevic, M.A., Schofield, P.R. y Rolfe, B.G. 1985. Tn5 mutagenesis of R.trifolii host specific nodulation genes result in mutants with altered host range ability. *Mol. Gen. Genet.* 200:

Djordjevic, S.P., Chen, H., Batley, M., Redmond, J.W. y Rolfe, B.J. 1987. Nitrogen-fixing ability of exopolysaccharides synthesis mutants of

Rhizobium .sp.strains NGR234 and R.trifolii is restored by the addition of homologous exopolysaccharide. J. Bacteriol. 169: 53.

Doherty, D.y.c. 1988. J. Bacteriol. 170: 4249-4256.

Dowling, D.N.y.B., W.J. 1986. Competition for nodulation of legumes. Annu. Rev. Microbiol. 40: 131-157.

Downie, J.A. 1989. The nod L gene from R.leguminosarum is homologous to the acetyl transferases encoded by lac A and cys E. Mol. Microbiol. 3: 1649-1651.

Downie, J.A. 1991. A nod of recognition. Curr. Opin. Biol. 1: 382-384.

Dudley, M.E., Jacobs, T.W. y Long, S.R. 1987. Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by R. meliloti. Planta 171: 286-301.

Dudman, W.F. 1981. The extracellular glucans of R.japonicum strain 311bb135. En: Current perspectives in nitrogen fixation. Gibson y Newton (eds) Australian Academy of Science. Camberra. 427

Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., De Bruijn, F. y Schell, J. 1989. The R.meliloti early nodulation genes (nod ABC) are nitrogen-regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. Mol. Gen. Genet. 219: 89-96.

Dylan, T., Ielpi ,L., Stansfield, S., Kashyap, L., Douglas, C. y col. 1986. R.meliloti genes requires for nodule development are related to chromosomal virulence genes in A.tumefaciens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4403-4407.

Dylan, T., Nagpal ,P., Helinski, D.R. y Ditta, G. 1990a. Symbiotic pseudorevertants of R.meliloti ndv mutant. J. Bacteriol. 172: 1409-1417.

Dylan, T., Helinski, D.R. y Ditta, G. 1990b. Hypoosmotic adaptation in R.meliloti requires b-(1,2)-glucan. J. Bacteriol. 172: 1400-1408.

Eckhardt, T. 1978. A rapid metod for the identification of plasmid DNA in bacteria. Plasmid 1: 584-588.

Economou, A., Hamilton, W.D.O., Johnston, A.W.B y Downie, J.A. 1990. The Rhizobium nodulation gene nod O encodes a Calcium-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. EMBO J. 349-354.

Evans, I.J.y.D., J.A. 1986. The Nod I product of R.leguminosarum is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins: nucleotide sequence of the nod I and nod J genes. Gene 43: 95-101.

Figurski, D.H.y.H., D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of a plasmid RK 2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. natl. Acad. Sci. USA 76: 1648-1652.

FinanT.M., K., B., De Vos,G.F., y Signer,E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid in R.meliloti carrying exopolysaccharide and thiamina synthesis genes. J.Bacteriol. 167: 66-72.

Fisher, R.F., Tu, J.K. y Long, S.R. 1985. Conserved nodulation genes in R.meliloti and R.trifolii. Appl. Env. microbiol. 49: 1432-1435.

Fisher, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1988. Specific binding of proteins from R.meliloti cell-free extracts containing Nod D to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. Genes Dev. 2: 282-293.

Fisher, R.F.y.L., S.R. 1989. DNA footprint analysis of the transcriptional activator proteins Nod D1 and Nod D3 on inducible nod gene promoters. J. Bacteriol. 171: 5492-5520.

Forde, B.G.y.C., J.V. 1989. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. En: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Mifflin (ed). 6: 247-296. Oxford: Clarendon.

Fortin, M.G., Zelechowska, M y Verma, D.P.S. 1985. Specific targeting of the membrane nodulins to the bacteroid enclosing compartment in soybean nodules. EMBO J. 4: 3041-3046.

Gaworzewska, E.T.y.C., M.J. 1982. Positive chemotaxis of *R.leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *Gen. Microbiol.* 128: 1179-1188.

Geiger, O., Spaink, H.P., y Kennedy, E.P. 1991. Isolation of the *R.leguminosarum* Nod F nodulatoin protein: Nod F carries a 4'-Phosphopantetheine prostetic group. *J. Bacteriol.* 173: 2872-2878.

Geiger, O., Weissborn, A.C.,y Kennedy, E.P. 1991a. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *R.meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* 173: 3021-3024.

Gil-Serrano, A., Sánchez del Junco, A., Tejero-Mateo, P., Megías, M. y Caviedes, M.A. 1990. Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *R.leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899. *Carbohydrate Research* 204: 103-107.

Gil-Serrano, A.M., Franco-Rodríguez, G., González-Jiménez, I., Tejero-Mateo, P., Molima, J., Dobado, J.A., Megías, M. y Romero, M.J. 1993. The structure and molecular mechanics calculations of the cyclic (1-2)- β -D-glucan secreted by *R. tropici* CIAT899. *J. Mol. Structure.* 301: 211-226.

Glazebrook, D.W.y.W., G.C. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *R.meliloti*. *Cell* 56: 661-672.

Gloudemans, T., Bhuvaneswari, T.V., Moerman, M., Van Brussel, T., van Kammen, A. y col. 1989. Involvement of *R. leguminosarum* nodulation genes in gene expression in pea root hairs. *Plant. Mol. Biol.* 12: 157-167.

Glucksmann, M.A., Reuber, T.L. y Walker, G.C. 1993. Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *R. meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 7045-7055.

Goethals, K., van den Eede, G., Montagu, M.V. y Holsters, M. 1990. Identification and characterization of a functional nod D gene in *A. caulinodans* ORS571. *J. Bacteriol.* 172: 2658-2666.

Goethals, K., van Montagu, M. y Holsters, M. 1992. Conserved motifs in a divergent nod box of *A. caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1646-1650.

González, J.E., glucjmann,A., Reuber,T.L. y Walker,G.C. 1993. Exopolysaccharides in *R.meliloti*-alfalfa interactions. Palacios y col., eds. *En New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer A.P. The Netherlands. 203-206

Govers, F., Gloudemans, T., Moerman, M., van Kamen, A. y Bisseling, T. 1986. *Rhizobium nod* genes are involved in inducing an early noduling gene. *Nature* 323: 5645-5666.

Göffert, M., Lamb, J.W., Gasser, R., Semenza, J. y Hennecke, H. 1989. Mutational analysis of the *B.japonicum* common nod genes and further nod box-linked genomic DNA regions. *Mol. Gen. Genet.* 215: 407-415.

Göttfert, M., Grob, P. y Hennecke, H. 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the nod V and nod W genes determinants of host specificity in *B.japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2680-2684.

Göttfert, M., Hitz, S., Hennecke, H. 1990a. Identification of nod S and nod U, two inducible genes inserted between the *B.japonicum* nod YABC and nod IJ genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 308-316.

Gray, J.X.y.c. 1990. *J. Bacteriol.* 172: 193-203.

Gray, J.X.y.R., B.G. 1990. Exopolisaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol. Microbiol.* 4(10): 1425-1431.

Gray, J.X., Zhan,H., Levery,S.B., Battisti,L., Rolfe,B.G. y Leigh,J.A. 1991. Heterologous exopolysaccharide production in *R.sp.* strain NGR234 and consequences for nodule development. *J.Bacteriol.* 173: 3066-3077.

Gulash, M., Ames, P., Larosiliere ,R.C. y Bergman, K. 1984. *Rhizobium* are attracted to localiced sites on legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 149-152.

Györgypal, Z., Kiss, G.B. y Kondorosi, A. 1991. Transduction of plant signal by the Rhizobium Nod D protein. *BioEssays* 13: 575-581.

Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA cloning: A practical approach*. Vol. 1. Glover (ed). IRL Press. Oxford. 109-135.

Harwig, U.A., Maxwel, C.A., Joseph, C.M. y Phillips, C.A. 1990. Effects of alfalfa nod gene-inducing flavonoids of nod ABC transcription in *R.meliloti* strains containing different nod D gene. *J. Bacteriol.* 172: 2769-2773.

Hellriegel, H.y.W., H. 1888. Beilagaheft zu des Zeitschrift des Vereins f.d. Rübenzucker-Industrie d. Deutschen Reiches.

Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo,J.M. y Wallace, J.C. 1988. A large family of bacterial activators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6602-6606.

Higashi, S. 1993. (Brady)Rhizobium-plant communications involved in infection and nodulation. *J. Plant. Res.* 106: 201-211.

Hisamatsu, M., Amemura ,A, Korzumi, K., Utamura, T y Okada, Y. 1983. Structural studies on cyclic (1,2)-b-D-glucans(cyclosophoraoses) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Carbohydr .Res.* 121: 31-40.

Hisamatsu, M., Yamada, T., Higashiura, T. e Ikeda, M. 1987. The production of acidic, O-acylated cyclosophorans (cyclid 1,2-beta-D-glucan) by *Agrobacterium* y *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* 163: 115-122.

Hitchcock, P.J.y.B., T.M. 1983. Morfphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrilamide gels. *J. Bacteriol.* 154: 269-277.

Hollingsworth, R.I.y.C., R.W. 1989. 27-Hidroxyoctacosanoic acid is a major structural component of the lipopolysaccharide of *R. trifolii* ANU843. *J. Biol. Chem.* 246: 9300.

Holsters, M., Geelen, D., Goetha, K., Van Montagu, M., Geremia, R., Prome, J.C. y Mergaert, P. 1993. Nod factor production by *A.caulinodans* strain ORS571. En: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios y col.(eds.). 191-196.

Honma, M.A.y.A., F.M. 1987. *R.meliloti* has three functional copies of the nod D symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8558-8562.

Hooykaas, P.J.J., Peerbolte, R., Regensburg-Tuïnk, A.J.G., de Vries, P. y Schilperoort, R.A. 1982. A chromosomal linkage map of *A.tumefaciens* and a comparison with the maps of *Rhizobium* spp. *Mol. Gen. Genet.* 188: 12-17.

Horvath, B., Bachem,C.W.B., Schell,J. y kondorosi,A. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by plant-signal, interacting with the nodD gene product. *EMBO J.* 6: 841-848.

Horvath , B., Kondorosi, E., John, M.,Schmidt, J., Török, I.,y col. 1986. Organization, structure and symbiotic function of *R.meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* 46: 335-343.

Hotter, G.S.y.S., D.B. 1991. Expolisaccharide mutants of *R .loti* are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host. *J. Bacteriol.* 173: 851-859.

Hungrá, M., Joseph, C.M. y Philiphs, D.A. 1991. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 97: 759-764.

Iñón de Iannino, N., y Ugalde, R.A. 1989. Biochemical characterization of avirulent *A.tumefaciens* chv A mutants: synthesis and excretion of b-(1,2)-glucan. *J. Bacteriol.* 171: 2842-2849.

Jelesko, J.G., Lara, J.C. y Leigh, J.A. 1992. *R.meliloti* mutants with decreased DAHP synthase activity are sensitive to exogenous tryptophan and phenylalanine and form ineffective nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 135-143.

John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. y Schell, J. 1993. Rhizobium Nod B protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 625-629.

Johnston , A.W.B., Setchell, S.M. y Beringer, J.E. 1978. Interspecific crosses between *R.leguminosarum* and *R.meliloti* : Formation of haploid recombinants and of R-primers. J. Gen. Microbiol. 104: 209-218.

Jonh, M., Schmidt, J., Wieneke, U., Krussmann, H.D. y Schell, J. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the *R.meliloti* modulation protein Nod C. EMBO J. 7: 583-588.

Kamoun, S.y.c. 1989. J. Bacteriol. 171: 1755-1759.

Kannenbergh, E.L.y.B., N.J. 1989. Expression of a cell surface antigen from *R.leguminosarum* 3841 is regulated by oxygen and pH. J. Bacteriol. 171: 4543-4548.

Karanja, N.K.y.W., M. 1988. Selecting *R.phaseoli* strains for use with beans (*P.vulgaris* L.) in Kenya: infectiveness aand tolerance of acidity and aluminium. Plant soil 112: 7-13.

Kerppola, T.K.y.K., M.L. 1985. Characterization of auxotrophs of *R.meliloti* 104A14 and cloning of the genes for carbamylphosphate synthase. En: Nitrogen fixation Reseaech Progress. Evans y col.(eds.). The Netherlands. 223-224.

Kerppola, T.K., y Kahn, M.L. 1988. Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *R.meliloti* 104A14. J. Gen. Microbiol. 134: 913-919.

Kijne, J.W., Smit, G., Díaz, C.L. y Lugtenberg, B.J.J. 1988. Lectin enhanced accumulation of manganese-limited *R. leguminosarum* cells of pea root hair tips. J. Bacteriol. 170: 2994-3000.

Kim, C., Kuikendall, L.D., Shah, K.S. y Keister, D.L. 1988. Induction of symbiotically defective auxotrophic mutants of *R.fredii* HH303 by transposon mutagenesis. App. Env. Microbiol. 54: 423-427.

Kim, C.-H., Tully, R.E. y Keister, D.L. 1989. Exopolysaccharide deficient mutants of *R.fredii* HH303 which are symbiotically effective. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1852.

Kingsley, M.T.y.B., B.B. 1992. Extracellular polysaccharide is not responsible for aluminum tolerance of *R.leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899. *App. Environ. Microbiol.* 4: 1095-1101.

Klein, S., Lohman, K., Clover, R., Walker, G.C. y Signer, E.R. 1992. A directional, high- frequency chromosomal mobilization system for genetic mapping of *R.meliloti*. *J. Bacteriol.* 174: 324-326.

Knauf , V.C.y.N., E.W. 1982. Wide host range cloning vectors: a closmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8: 45-54.

Koch, B.y.E., J. 1966. Reduction of acetilene to etylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.* 41: 1748-1760.

Kombrink, E., Schroeder, M. y Hahlbrock, K. 1988. Several "pathogenesis-related " proteins in potato are 1,3-b-glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 782-786.

Kondorosi, A., Svab, Z., Kiss, G.B. y Dixon, R.A. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 151: 221-226.

Kondorosi, A., Vineze, E., Johnston, A.W.B. y Beringer, J.E. 1980. A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. *Mol. Gen. Genet.* 178: 403-408.

Kondorosi, A., Kondorosi, E., Pankhurst, C.E., Broughton, W.J. y Banfalvi, Z. 1982. Mobilization of a *R.meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 188: 433-439.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. 1984. Physical and genetic analysis of a simbiotic region of *R.meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193:

Kondorosi, E., Buiré, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B. y Kondorosi, A. 1989. Positive and negative control of nod gene expression in *R.meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* 8: 1331-1341.

Kondorosi, A. 1992. Regulation of nodulation genes in rhizobia. En: *Molecular signal in Plant-Microbe Communication*. 1992. Verma (ed) 325-340.

Kossla, R.M., Joshi, R.S., Bowen, B.A., Paaren, H.E. y Appelbaum, E.R. 1990. Strain-inhibition of nod gene induction in *B.japonicum* by flavonoid compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1333-1341.

Kraus, J.y.K., M.L. 1988. Glutamate catabolism by *R.meliloti* 104A14. *Molecular Genetics of Plant microbe Interactions*. Palacios y Verma (eds) American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 135-136.

Krishnan, H.B. 1992. *Mol. Microbiol.* 6: 3321-3330.

Laguerre, G., Fernández, M.P., Edel, V., Norman, P. y Amarger, N. 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *P.vulgaris* L. *Int. J. Systemac. Bacterio.* 43: 761-767.

Larsen, K.y.J., B.U. 1986. Expression of nodule specific uricase in soybean callus tissue is regulated by oxygen. *EMBO J.* 5: 15-19.

Le Strange, K.K., Bender, G.L., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. y Redmond, J.W. 1990. The *Rhizobium* strain NGR234 nod D1 gene product responds to activation by the simple phenolic compounds vanillin and isovanillin present in wheat seedling extracts. *J. Bacteriol.* 3: 214-220.

Leigh, J.A., Signer, E.R. y Walker, G.C. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *R.meliloti* that form ineffective nodules. *Proc .Natl. Acad. Sci.* 82: 6231-6235.

Leigh, J.A., Redd, J.W., Hanks, J.F., Hirsch, A.M. y Walker, G.C. 1987. *R.meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* 51: 579-587.

Leigh, J.A.y.L., C.C. 1988. Characterization of polysaccharides of *R.meliloti* exo mutants that form ineffective nodules. *J. Bacteriol.* 170: 3327-3332.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C. y Denarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *R.meliloti* is determined by a sulphated and acetylated glucosamine oligosaccharide. *Nature* 344: 781-784.

Lewin, A., Cervantes, E., Wong, C.H. y Broughton, W.J. 1990. Nod SU, two new nod genes of the broad host-range *Rhizobium* strain NGR234 encode host specific nodulation of the tropical tree *Leucaena Leucocephala*. *Mol. Plan- Microbe Interact.* 3: 317-326.

Lie, T.A. 1978. Symbiotic specialization in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan. *Annu. Appl. Biol.* 88: 462-465.

Lipsanen, P.y.L., K. 1989. Lipopolysaccharide and protein patterns of *Rhizobium* sp. (*Galega*). *FEMS Microbiol. Lett.* 58: 323-328.

Long, S., Reed, J.W., Himawan, J. y Walker, G.C. 1988. Genetic analysis of a cluster of genes required for the synthesis of a Calcofluor-binding exopolysaccharides of *R.meliloti*. *J. Bacteriol.* 170: 4239-4248.

Long, S.R.y.c. 1989. En: *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*. Lugtenberg (ed). Berlin: Springer-Verlag. 145-151.

Lugtenberg, B.J.J., Díaz, C.L., Smit, G., De Pater, S. y Kijne, J.W. 1991. Roles of the lectins in the *Rhizobium* -legume symbiosis. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe interactions*. Dordrecht: Kluwer Academic.

Maillet, F., Debellé, F. y Dénarié, J. 1990. Role of the nod D and syr M genes in the activation of the regulatory gene nod D3, and of the common and host specific nod genes of *R.meliloti*. *Mol. Microbiol.* 4: 1975-1984.

Maniatis, F., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Marie, C., Barny, M.A. y Downie, J.A. 1992. *R.leguminosarum* has two glucosamine synthases, Gls M y Nod M, required for nodulation and development of nitrogen fixing nodules. *Mol. Microbiol.* 6: 843-851.

Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R. y Cevallos, M.A. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *P. vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1779-1786.

Martínez, E., Palacios, R. y Sánchez, F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *A.tumefaciens* harboring *R.phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169: 2828-2834.

Martínez, E., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Dávila, G. y Palacios, R. 1988. *R.phaseoli* : a molecular genetics view. *Plant Soil* 108: 179-184.

Martínez, E., Romero, D. y Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9: 59-93.

Martínez, E.y.R., M. 1990. Increased bean (*P.vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:

Martínez, E., Poupot, R., Prome, J.C., Pardo, M.A., Segovia, L., Truchet, G. y Denarie, J. 1993. Chemical signaling of *Rhizobium* nodulating bean. En: Palacios y col (eds.). *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer A. P. The Netherlands. 171-175.

Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.,A., Graham,P. y Pardo, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L.Beans and *Leucena* sp. trees. *Internacional journal of systematic bacteriology* 41,numero3: 417-426.

Marvel, D.J., Kuldau, G., Hirsch, A., Richards, E., Torrey, J.G. and Ausubel, F.M. 1985. Conservation of nodulation genes between *R.meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a non-legume host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 5841-5845.

Marvel, D.J., Kuldau, G., Hirsch, A., Richards, E., Torrey, J.G. y Ausubel, F.M. 1985. Conservation of nodulation genes between *R. meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a non-legume host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5841-5845.

Mc Neil, M., Darvill, J., Darvill, A.G., Albersheim, P., Van Veen, R., Hooykaas, P., Schilperoort, R. y Dell, A. 1986. The discernible structural features of the acidic polysaccharides secreted by different *Rhizobium* species are the same. *Carbohydr. Res.* 146: 307-326.

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

Megías, M., Caviedes, M.A., Palomares, A.J. y Perez-Silva, J. 1982. Use of plasmid R68.45 for constructing a circular linkage map of the *R.trifolii* chromosome. *J. Bacteriol.* 149: 59-64.

Megías, M. Universidad de Sevilla. Comunicación Personal.

MeIver, J., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Bender, G.L. y Rolfe, B.G. 1989. Extension of host range of *R.leguminosarum* bv. *trifolii* caused by point mutations in nod D that result in alterations in regulatoty function and recognition of inducer molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 97-106.

Mellor, R.B.y.W., D. 1987. Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume roots nodules. *Symbiosis.* 3: 75-100.

Michiels, K.W., Vanderleyden, J., Von Gool, A.P. y Signer, E.R. 1988. Isolation and characterization of *A.braziliense* loci that correct *R.meliloti* exo B and exo C mutations. *J. Bacteriol.* 170: 5401-5404.

Miller, K.J., Kennedy, E.P., y Reinhold, V.N. 1986. Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 231: 48-51.

Miller, K.J., Reinhold, V.N., Weissborn, A.C. y Kennedy, E.P. 1987. Cyclic glucan produced by *A.tumefaciens* are substituted with sn-1-phosphoglycerolresidues. *Biochim. Biophys. Acta* 901: 112-118.

Milner, J., Araujo, R.S. y Handelsman, J. 1992. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *R.tropici* strain CIAT899. *Mol. Microbiol.* 6(21): 3137-3147.

Mulligan, J.T.y.L., S.R. 1989. *Genetics* 122: 7-18.

Müller, P., Hynes, M., Kapp., D., Niehaus, K. y Pühler, A. 1988. Two classes of *R.meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* 211: 17.

Nap, J.P.y.B., T. 1990. Developmental biology of a plant prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948-954.

Newcomb, W., Sipell, D. y Peterson, R.L. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* 57: 2603-2616.

Nikaido, H.y.V., M. 1985. Molecular basis of bacterial outer permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-19.

Noel, K.D., Vandenbossch, K.A. y Kulpaca, B. 1986. Mutations in *R.phaseoli* that lead to arrested development in infection threads. *J. Bacteriol.* 168: 1392-1401.

Noel, K.D., Diebold, R.J., Cava, J.R. y Brink, B.A. 1988. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementatio, genetic analysis, aand the symbiotic requirement for the novo purine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 149: 499-506.

Noel, K.D. 1992. Rhizobial polysaccharides required in symbiosis with legumes. En: *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. Verma (ed).

Norrander, J., Kempe, T. y Messing, J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106.

Norris, J.H.L., Macol, A. y Hirsch, A.M. 1988. Nodulin gene expression in alfalfa nodules and in nodules arrested at three different stages of development. *Plant Physiol.* 88: 321-328.

Nutman, P.S. 1976. Alternative sources of nitrogen for crops. *J. Agric. Soc.* 86-94.

O'Connell, K.y.H., J. 1993. Foliar chlorosis in symbiotic host and nonhost plants induced by *R.tropici* type B strains. *App. Environ. Microbiol.* 59: 2184-2189.

Owens, L.D.y.W., D.A. 1965. Production of the soybean-chlorosis toxin by *R.japonicum* in pure culture. *Plant Physiol.* 40: 931-933.

Padilla, J.E., Campos, F., Conde, V., Lara, M. y Sánchez, F. 1987. Nodule-specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9: 65-74.

Pain, A.N. 1979. Symbiotic properties of antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of *R.leguminosarum*. *J. App. Bacteriol.* 47: 53-64.

Pankhurst, C.E., Schwinghamer, E.A. y Bergersen, F.J. 1972. The structure and acetylene-reducing activity of root nodules formed by a riboflavin-requiring mutant of *R.trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 70: 161-177.

Pankhurst, C.E.y.S., E.A. 1974. Adenine requirement for nodulation of pea by an auxotrophic mutant of *R.leguminosarum*. *Arch. Microbiol.* 100: 219-238.

Pate, J.S.y.A., C.A. 1983. Nitrogen uptake, transport and utilization. En *Nitrogen Fixation 3: Legumes*. Broughton (ed.). Oxford University Press. New York.: 245.

Peters, N.K., Frost, J.W. y Long, S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *R.meliloti* nodulation genes. *Science* 233: 977-980.

Petrovics, G., Putnoky, P., Reush, B., Kim, J., Thorp, T.A., Noel, K.D., Carlson, R.W. y Kondorosi, A. 1993. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *R.meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol.* 8: 1083-1094.

Pilacinski, W.P.y.S., E.I. 1981. Plasmids transfer within and between serologically distinct strains of *R.japonicum*, using antibiotic resistance mutants and auxotrophs. *J. Bacteriol.* 145: 1025-1030.

Poupot, R., Martínez ,E. y Promé, J.C. 1993. Nodulation factors from *R. tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosaminyl terminus. *Biochem.* 32: 10430-10435.

Priefer, U.B. 1989. Genes involved in lipopolisaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *R.leguminosarum* bv.viciae VF39. *J. Bacteriol.* 171: 6161.

Priefer, U.B., Bathe, B., Preisler, S., Schultz, M., Siemer, B. y Prechel, H. 1992. En: Genetic and molecular analysis of a chromosomal gene cluster involved in LPS biosynthesis in *R.leguminosarum* bv. viciae. Sixth International Symposium on Molecular Plant Microbe-Interactions. Seattle. USA.

Primerano, D.A.y.B., R.O. 1983. Role of acetohydroxy acid isomeroreductase in biosynthesis of pathogenic acid in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 153: 259-269.

Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Ha, D,T.C., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. 1990. *R.meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* 172: 5450-5458.

Puvanesarajah, V., Schell, F.M., Stacey, G., Douglas, C.J. y Nester, E.W. 1985. Role for two linked β -S-glucan in the virulence of *A.tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 164: 102-106.

Puvanesarajah, V., Shell, F.M., Gerhold, D. y Stacey, G. 1987. Cell surface polysaccharide from *B.japonicum* and a non nodulating mutant. *J. Bacteriol.* 169: 137-141.

Pühler, A., Enenkel, B., Hillemann, A., Kapp, D., Keller, M., Müller, P., Niehaus, K., Priefer, U.B., Quaandt, J. y Schmidt, C. 1988. *R.meliloti* and *R.leguminosarum* mutants defective in surface polysaccharide synthesis and root nodule development. En: *Nitrogen Fixation: Hundred years after*. Fischer (ed). Stuttgart. New York.

Ramakrishnan, N., Prakash, R.K., Shantharam, S., Duteau, M.N. y Atherly, A.G. 1986. Molecular cloning and expression of *R.fredii* USDA193 nodulation genes: extension of host range for nodulation. *J. Bacteriol.* 168: 1087-1095.

Recourt, K., van Brussel, A.A.N., Driessen, A.J.M. y Lugtenberg, B.J.J. 1989. Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane in *R.leguminosarum* bv. *viciae* is caused by the pH dependent hydrophobicity of naringenin. *J. Bacteriol.* 171: 4370-4377.

Recourt, K., Schripsema, J., Kijne, J.W., van Brussel, A.A.N. y Lugtenberg, B.J.J. 1991. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *R.leguminosarum* bv. *viciae* results in release of nod gene activating flavanones and chalcones. *Plant Mol. Biol.* 16: 841-852.

Reed, J.W.y.W., G.C. 1991. Acidic conditions permit effective nodulation of alfalfa by invasion-deficient *R.meliloti* exo D mutants. *Genes Develop.* 5: 2274-2287.

Reed, J.W.y.W., G.C. 1991a. The exo D gene of *R.meliloti* encodes a novel function needed for alfalfa nodule invasion. *J. Bacteriol.* 173: 664-677.

Relic, B., Fellay, R., Lewin, A., Perret, X., Price, N.P.J., Rochepeau, P. y Broughton, W.J. 1993. nod genes and nod factor of *Rhizobium* species NGR234. En: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios y col.(eds.)

Reuber, T.L., Long, S. y Walker, G.C. 1991. Regulation of *R.meliloti* exo genes in free-living cells and in planta examined by using TnphoA fusions. *J. Bacteriol.* 173: 426-434.

Reuber, T.L.y.W., G.C. 1993a. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *R.meliloti* Rm1021. *J.Bacteriol.* 175: 3653-3655.

Reuber, T.L.y.W., G.C. 1993b. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *R.meliloti*. *Cell* 74: 269-280.

Reush, B.L., Carlson, R.W. y Kim, J.S. 1993. *R.fredii* and *R.meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *E.coli*. *J. Bacteriol.* 175: 3570-3580.

Roche, P., Debelle, F.,Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C. y col. 1991. Molecular basic of symbiotic host specificity in *R.meliloti*: nod H and nod PQ gene encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67: 1131-1143.

Rodriguez-Quiñones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P. y Kondorosi, A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant. Mol. Biol.* 8: 61-76.

Rodriguez-Quiñones, F., Fernández- Burriel, M., Banfalvi, Z., Megías, M. y Kondorosi, A. 1989. Identification of a conserved, reiterated DNA region that influences the efficiency of nodulation in strain RS1051. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 2: 75-83.

Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Dusha, I., David, M. y Boucher, C. 1982. Megaplasmids in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 150: 402-406.

Rushing, B.G., Yelton, M.M. y Long, S.R. 1991. Genetic and phisycal analysis of the nod D3 region of *R.meliloti*. *Nucleic Acids. Res.* 19: 921-927.

Sadowsky, M.J., Rostas, K., Sista, P.R., Bussey, H y Verma ,D.P. 1986. Symbiotically defective histidine auxotrophs of *B.japonicum*. *Arch. Microbiol.* 144: 334-339.

Sadowsky, M.J., Cregan, P.B., Gottfert, M., Sharma ,A. y Gorhold, D. 1991. The *B.japonicum* *nodA* and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2^o Ed., Cold Spring harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:

Sánchez, F., Padilla, J.E., Pérez, H. y Lara, M. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 507-528.

Scheres, B., Van Engelen,F., Van der Kanaap,E., Van de Wiel,C., Van Kammen,A. y Bisseling,T. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *The plant cell* 2: 687-700.

Scherrer, A. 1973. Etude quantitative de la compétition pour la formation des nodules de luzerne entre una souche de *R.meliloti* et un de ses mutants auxotrophes pour la glycine. *Annales dePhytopathologie.* 5:

Scherrer , A.y.D., J. 1971. Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of *R.meliloti* and of their prototrophic revertans. *Plant and Soil. Special:* 39-45.

Schlaman, H.R.M., Spaik, H.P., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. 1989. Subcellular localization of the *nodD* gene product in *R.leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 191: 4686-4693.

Schlaman, H.R.M., Okker, R.H.J. y Lugtenberg, B.J.J. 1990. Subcelular localization of the *R.leguminosarum* *nodI* gene product. *J. Bacteriol.* 172: 5486-5489.

Schlaman, H.R.M., Horvath, B., Vijgenboom, E., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. 1991. Supression of nodulation gene expression in bacteroids of *R.leguminosarum* bv.viciae. *J. Bacteriol.* 173: 4277-4287.

Schlaman, H.R.M., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. 1992. Regulation of nodulation gene expression by Nod D in Rhizobia. *J. Bacteriol.* 174: 5177-5182.

Schmidt, J., John, M., Wieneke, U., Krüssmann, H.D. y Schell, J. 1986. Expression of the nodulation gene nod A in *R.meliloti* and localization of the gene product in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9581-9585.

Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., y col. 1992. *R.meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting diferent degrees of plant specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 192-196.

Schwedock, J.y.L., S.R. 1989. Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *R.meliloti*, nod P and nod Q. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 181-194.

Schwedock, J.y.L., S.R. 1990. ATP sulfurylase activity of the nod P and nod Q gene products of *R.meliloti*. *Nature* 348: 644-647.

Schwinghamer, E.A. 1967. Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for resistance to antibiotics. *J. Microbiol. Serol.* 33: 121-136.

Schwinghamer, E.A. 1970. Requirement for riboflavin for effective symbiosis on clover by an auxotrophic mutant of *R.trifolii*. *Australian Journal of Biological Sciences.* 23: 1187-1196.

Scott, D.B., Court, C.B., Ronson, C.W., Scott, K.F., Watson, J.M., Schofield, P.R. y Shine, J. 1984. Organisation of nodulation and nitrogen fixation genes on a *R.trifolii*. *Arch. Microbiol.* 139: 151-157.

Sen, D.y.W., R.W. 1984. A basis for different rates of different rates of N₂-fixation by the same strain of Rhizobium in peanut and cowpea root nodules. *Plant Sci. Lett.* 34: 239-246.

Sharma, S.B.y.S., E.R. 1990. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta revealed by Tn-5-gusA. *Genes Dev.* 4: 344-356.

Short, J.M., Fernández, J.M., Sorge, J.A. y Huse, W.D. 1988. Lambda ZAP: A bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16: 7583-7600.

Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791.

Smit, G., Kijne, J.W. y Lugtenberg, B.J.J. 1987. Both cellulose fibrils and a calcium dependent adhesin are involved in the attachment of *R.leguminosarum* to pea roots hair tips. *J. Bacteriol.* 171: 569-572.

Smit, G., Kijne, J.W. y Lugtenberg, B.J.J. 1989. Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a calcium dependent cell surface protein in attachment of *R.leguminosarum* bv. *viciae* to pea roots hair tips. *J. Bacteriol.* 171: 569-572.

Smith, G.B.y.W., A.G. 1992. Physicochemical and D-galactose-mediated interactions in the attachment of *B.japonicum* to roots of *Glycine max.* *Can. J. Microbiol.* 39: 245-251.

So, J.S., Hodgson, A.L.M, Haugland, R., Leavitt, M., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A.J. y Stacey, G. 1987. Transposon-induced symbiotic mutants of *B.japonicum*: Isolation of two gene regions essential for nodulation. *Mol. Gen. Genet.* 207: 15-23.

Soberón, G. 1985. Mecanismo de nodulación de las leguminosas. *Investigación y Ciencia. Edición en español de Scientific American.* 103: 6-13.

Soberón, M., Membrillo-Hernández, J., Aguilar, G.R. y Sánchez, F. 1990. Isolation of *R. phaseoli* Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases o and aa3. *J. Bacteriol.* 172: 1676-1680.

Sousa, C., Folch, J.L., Boloix, P., Megías, M., Nava, N. y Quinto, C. 1993. A *R.tropici* DNA region carrying the amino-terminal half of a nod D gene and a nod-box-like sequence confers host-range extension. *Mol. Microbiol.* 9(6): 1157-1168.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Spaink, H.P., Weinman, J., Djordjevic, A., Wijffelman, C.A., Okker, J.H. y Lugtenberg, B.J.J. 1989. Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity-determining Nod E protein. *Embo J.* 8: 2811-2818.

Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. 1989a. Localization of functional regions of the *Rhizobium* nod D product using hybrid nod D gene. *Plant Mol. Biol.* 12: 59-73.

Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S. y col. 1991. A novel high unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 125-130.

Spaink, H.P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., Kennedy, E.P. 1991a. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 72-80.

Spaink, H.P. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answer and questions. *Plant Mol. Biol.* 20: 977-986.

Stacey, G., Burry, R.H. y Evans, H.J. 1992. Biological nitrogen fixation.

Standfield, S.W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D.R. y Ditta, G.S. 1988. The ndv A gene product of *R.meliloti* is required for b-(1,2)glucan production and has homology to the ATP-binding export protein Hly B. *J. Bacteriol.* 170: 3523-3530.

Streit, W., Kosch, K. y Werner, D. 1992. Nodulation competitiveness of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. tropici* strains measured by glucuronidase (*gus*) gene fusion. *Biol. Fertil Soils*. 14: 140-144.

Surin, B.P.y.D., J.A. 1988. Characterization of the *R.leguminosarum* gene *nod LMN* involved in efficient nod-specific nodulation. *Mol. Microbiol.* 2: 173-183.

Surin, B.P.y.D., J.A. 1989. *Plant. Mol. Biol.* 12: 19-29.

Surin, B.P., Watson, J.M., Hamilton, W.D.O., Economou ,A. y Downie,J.A. 1990. Molecular characterization of the nodulation gene, *nod T*, from two biovars of *R. leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4: 245-252.

Sutton, M.J., Lea, E.J.A., Crank, S., Rivilla, R., Economou, A., Ghelani, S., Johnston, A.W.B. y Downie, J.A. 1993. *Nod O*: A nodulation proteins that form pores in membranes. *Advances in Molecular Genetics of Plaant-Microbe Interactions.*Nester y Verma (eds.) 163-167.

Tabor, S.y.R., C.C. 1987. DNA sequences analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4767-4771.

Tao, H.y.N., D. 1990. Nitrogen Fixation Congress. Knoxville,TN, (abstrad).

Tao , H., Brewin, N.J. y Noel, K.D. 1992. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by enviromental conditions. *J. Bacteriol.* 174: 2222-2229.

Truchet, G., Michel, M. y Denarié, J. 1980. Sequential analysis of the organogenesis of Lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically-defective mutants of *R.meliloti*. *Differentiation* 16: 163-172.

Truchet, G., Barker, D.G., Camut, S., De Billy, F., Vasse, J. y Huguet, T. 1989. Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 65-68.

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S. y col. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *R.meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351:

Tully, R.E.y.T., M.E. 1985. Decreased exopolisaccharide synthesis by anaerobic and symbiotic cells of *B. japonicum*. *Plant Physiol.* 79: 445.

Urzainqui, a.y.W., G.C. 1992. Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *R.meliloti* exo mutants. *J.Bacteriol.* 174: 3403-3406.

Uttaro, A.D., Cangelosi,G.A., Geremia,R.A., Nester,E.W. y Ugalde,R.A. 1990. Biochemical characterization of avirulent exoC mutantas of *A.tumefaciens*. *J.Bacteriol.* 172: 1640.

van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Sprosen, P.C., Spaik, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J. y Kijne, J.W. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 70-72.

van de Wiel, C., Scheres,B., Franssen,H., Van Lierop,M.J., Van Lammeren,A., Van Kammen,A. y Bisseling,T. 1990. The early nodulin transcript, ENOD2 is located in the nodule poremchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* 9: 1-7.

van Rhijn, P.J.S., Feys, B., Verreth, C. y Vanderleyden, J. 1993. Mutiple copies of nod D in *R.tropici* CIAT899 and BR816. *J. Bacteriol.* 175: 438-447.

Vance, C.P.y.G., S.M. 1988. The molecular biology of N metabolism. En: *Advanced Plant Physiology and Molecular Biology*. Turpin y Dennis (eds.) Essex: Longman Scientific.:

Vandenbosch, K.A., Noel, K.D., Kaneko, K., y Newcomb, E.H. 1985. Nodule initiation elicited by noninfective mutants of *R.phaseoli*. *J. Bacteriol.* 162: 950-959.

VandenBosch, K.A., Brewin, N.J. y Kannenberg, E.L. 1989. Developmental regulation of a *Rhizobium* cell surface antigen during growth of root-nodules. *J. Bacteriol.* 171: 4537-4542.

Vargas, A.A.T.y.G., P.H. 1988. *P.vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strains variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Res.* 19: 91-101.

Vargas, A.A.T.y.G., P.H. 1989. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. *Plant Soil* 117: 195-200.

Vargas, C., Martínez, L.J., Megías, M. y Quinto, C. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *R.leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CIAT899. *Mol. Microbiol.* 4(11):

Vincent, J.M. 1974. Root nodule symbiosis with *Rhizobium*. En: *The Biology of Nitrogen Fixation*. Quispel (ed). North Holland Pub Co, Amsterdam, 265-341.

Walton, D.A.y.M., B.E.B. 1981. Induced mutagenesis in *R.trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 124: 191-195.

Wells, S.E.y.K., L.D. 1983. *J. Bacteriol.* 156: 1356-1358.

Williams, M.N.V., Hollingsworth, R.I., Klein, S. y Signer, E.R. 1990. The symbiotic defect of *R.meliloti* exopolysaccharide mutants is suppressed by *lps Z*, a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* 172: 2622-2632.

Williams, M.N.V., Hollinsworth, K.I., Brzoska, P.M. y Signer, E.R. 1990a. *R.meliloti* chromosomal loci required for suppression of exopolisaccharide mutations by lipopolisaccharide. *J. Bacteriol.* 172: 6596.

Wood, E.A., Butcher, G.W., Brewin, N.J. y Kannenberg, E.L. 1989. Genetic derepression of a developmentally regulated lipopolysaccharide antigen from *R.leguminosarum* 3841. *J. Bacteriol.* 171: 4549-4555.

Young, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological nitrogen fixation*. Stacey: 42-86.

Zhan, H., Gray, J.X., Lavery, S.B., Rolfe, B.G. y Leigh, J.A. 1990. Functional and evolutionary relatedness of genes for exopolysaccharide synthesis in *R. meliloti* and *R. sp.* strain NGR234. *J. Bacteriol.* 172: 5245-5253.

Zhan, H., Lee, C.C. y Leigh, J.A. 1991. Induction of the second exopolysaccharide (EPS_b) in *R. meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J. Bacteriol.* 173: 7391-7394.

Zorreguieta, A.y.U., R.A. 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -(1,2)-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 167: 947-951.

Zorreguieta, A., Geremia, R.A., Cavaignac, S., Cangelosi, G.A., Nester, E.W. y Ugalde, R.A. 1988. Identification of a product of an *A. tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 121-127.

UNIVERSIDAD DE CORDOBA

Reunido el Tribunal de Examen de Tesis Doctorales firmantes
en el día de la fecha, el Tribunal de Tesis Doctoral de
D. MACARENA TERINERO CARO

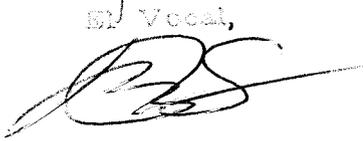
titulada ESTUDIO DE LA REGION del QUE AFECTA A LA
SIMBIOSIS Rhizobium tropici - Phaseolus vulgaris

acordó otorgarle la graduación de APTO CUM LAUDE

Cordoba, 7 de Julio 1994

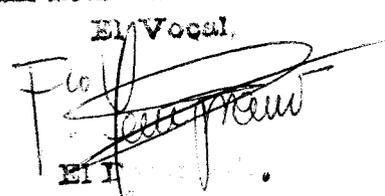
El Vocal,


El Presidente

El Vocal,


El Secretario,



El Vocal,


El II

