

R. 8387

T-450

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTANTES EXO EN
RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. *PHASEOLI* CIAT899


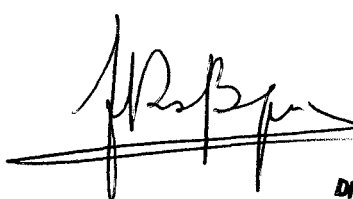
MEMORIA QUE PRESENTA DÑA. MARIA JESUS ROMERO VAZQUEZ EN LA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA PARA OPTAR
AL GRADO DE LICENCIADA

SEVILLA, OCTUBRE DE 1990

FRANCISCO RUIZ BERRAQUERO, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO: Que la Tesis de Licenciatura titulada: "Aislamiento y caracterización de mutantes Exo en *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899" presentada por Dña. MARIA JESUS ROMERO VAZQUEZ para optar al grado de Licenciada en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de esta Universidad bajo la dirección del Dr. D. MANUEL MEGIAS GUIJO.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla a quince de Octubre de mil novecientos noventa.



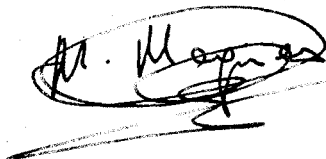
DPTO. DE MICROBIOLOGIA
Y
PARASITOLOGIA

Fdo.: Francisco Ruiz Berraquero

MANUEL MEGIAS GUIJO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO: Que la Tesis de Licenciatura titulada:
"Aislamiento y caracterización de mutantes Exo en *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899"
presentada por Dña. MARIA JESUS ROMERO VAZQUEZ para optar al grado de Licenciada en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla bajo mi dirección y reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a quince de Octubre de mil novecientos noventa.

A handwritten signature in black ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature appears to read 'M. Megías Guijo'.

Fdo.: Manuel Megías Guijo

Parte de estos resultados han sido presentados en el 5th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. (Septiembre, 1990. Interlaken, Suiza)

Hoy, al ver concluido este trabajo, es mi deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

Al Prof. Dr. D. Francisco Ruiz Berraquero, por permitirme trabajar en este laboratorio y poner en mis manos todo el material que he necesitado.

Al Prof. Dr. D. Antonio Gil Serrano, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, por su colaboración.

Al S.I.A.(Servicio de Investigaciones Agrarias), por permitirme usar sus instalaciones, y en especial a Dulce por facilitarme la labor allí realizada.

Al Prof. Dr. D. Manuel Megías Guijo, mi director, a quien siempre admiraré por su afán de saber; por encauzarme en el mundo de la ciencia y por darme la oportunidad de trabajar junto a él, ayudándome a confiar en mi misma; por su amor al trabajo y su constante preocupación por quienes le rodean.

Al Prof. Dr. D. Miguel A. Caviedes Formento, por tener siempre la palabra justa en el momento adecuado; por su apoyo moral y profesional; por su gran bondad y humanidad.

A Carolina, mi maestra, mi compañera y mi amiga, porque tanto en los ratos buenos como en los malos supo desatar en mi una sonrisa, haciéndome sentir bien cada minuto que he permanecido en este laboratorio.

A Beatriz y Angel, por su apoyo, su ayuda incondicional y su amistad.

A Macarena, por ayudarme en el trabajo y por ser una buena compañera.

A mi abuela y mis hermanos, por su gran cariño y por hacerme feliz durante todos los días de mi vida, por soportar mi mal humor y celebrar mis pequeños triunfos.

No puedo expresar con palabras el profundo agradecimiento que siento hacia mis grandes amigos M^a. del Mar y Miguel Angel, no sólo porque me ayudaron en el terreno profesional, sino porque siempre estuvieron junto a mi, en lo bueno y sobre todo en lo malo; porque siempre me escucharon, me apoyaron y me quisieron. Me siento orgullosa de poder contar con ellos.

En estos momentos no puedo olvidar a Beatriz y Miguel Angel, que siempre han estado a mi lado y han hecho más agradable mi existencia fuera del Departamento. Por su gran amistad.

He de mencionar de igual forma a Mamen, Carmen Gutierrez, Rosario, Pura y a todos los demás miembros del departamento, porque con un rapapolvos bien merecido o con una palabra agradable han contribuido a que esta Tesina llegara a su fin. Muchas gracias.

A mi madre, por su constante apoyo y su ternura y por darme fuerzas aunque a ella misma le faltaran.

A Pepe, sencillamente por todo, por su infinito amor y paciencia, y porque sin él no hubiera llegado hasta donde lo he hecho.

A mi querido padre, en su memoria, para que este humilde trabajo sirva de homenaje a quien tanto se sacrificó y luchó por mí.

Siempre os querré.

INDICE

| | <u>Pág.</u> |
|---|-------------|
| I. INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.- La fijación biológica de nitrógeno..... | 2 |
| 2.- Taxonomía..... | 5 |
| 3.- Interacción <i>Rhizobium</i> -planta..... | 8 |
| 3.1.- Colonización y adhesión a la raíz..... | 9 |
| 3.2.- Curvatura del pelo radical..... | 9 |
| 3.3.- Infección..... | 9 |
| 3.4.- Desarrollo del nódulo..... | 10 |
| 3.5.- Diferenciación de bacteroides y fijación de nitrógeno..... | 11 |
| 4.- Genética de <i>Rhizobium</i> | 11 |
| 5.- Estudio del exopolisacárido bacteriano..... | 16 |
| 5.1.- Estudio genético..... | 16 |
| 5.2.- Estructura del EPS ácido de <i>Rhizobium</i> | 21 |
| II. OBJETIVOS..... | 27 |
| III. MATERIAL..... | 29 |
| 1.- Microorganismos..... | 30 |
| 2.- Plantas..... | 30 |
| 3.- Antibióticos..... | 30 |
| 4.- Medios de cultivo..... | 30 |
| 4.1.- Medio TY..... | 39 |
| 4.2.- Medio LB..... | 39 |
| 4.3.- Medio LB calcofluor..... | 40 |
| 4.4.- Medio 79 de Allen..... | 41 |
| 5.- Soluciones nutritivas para plantas..... | 41 |
| 5.1.- Soluciones stocks..... | 41 |

| | Pág. |
|--|------|
| 5.1.1.-Microelementos: Medio australiano. | 41 |
| 5.1.2.- EDTA-Fe..... | 42 |
| 5.1.3.- CaCl ₂ | 42 |
| 5.2.- Solución nutritiva..... | 42 |
| 6.- Tampones..... | 43 |
| 6.1.- Tampón Fosfato..... | 43 |
| 6.2.- Tampón Tris-acetato..... | 43 |
| 7.- Enzimas e isótopos..... | 44 |
| IV. METODOS..... | 45 |
| 1.- Conjugación..... | 46 |
| 1.1.- Conjugación en membrana..... | 46 |
| 1.2.- Conjugación en placa..... | 47 |
| 2.- Mutagénesis con Tn5..... | 47 |
| 3.- Complementación de mutantes con cósmidos porta- dores de genes <i>exo</i> de <i>R. meliloti</i> | 51 |
| 4.- Estudio del polisacárido extracelular..... | 51 |
| 4.1.- Producción..... | 51 |
| 4.2.- Extracción..... | 53 |
| 4.3.- Purificación..... | 53 |
| 4.4.- Análisis..... | 54 |
| 4.4.1.- Cromatografía líquida de alta re- solución..... | 54 |
| 4.4.2.- Determinación cuantitativa de azú- cares por cromatografía gas-líqui- do..... | 55 |

| | <u>Pág.</u> |
|---|-------------|
| 4.4.2.1.- Preparación de los acetatos de alditoles..... | 56 |
| 4.4.2.2.- Instrumentación y condiciones cromatográficas.. | 56 |
| 5.- Test de nodulación..... | 57 |
| 5.1.- Esterilización de las semillas..... | 57 |
| 5.2.- Germinación de las semillas..... | 57 |
| 5.3.- Crecimiento de la planta en solución nutritiva..... | 58 |
| 5.4.- Inoculación..... | 58 |
| 5.5.- Ensayo de efectividad..... | 59 |
| 6.- Reaislamiento de <i>Rhizobium</i> a partir de nódulos.. | 60 |
| 7.- Electroforesis en gel de agarosa..... | 60 |
| 8.- Recuperación del ADN a partir de los geles..... | 61 |
| 9.- Extracción y purificación de ADN..... | 61 |
| 9.1.- ADN total..... | 61 |
| 9.2.- ADN plasmídico..... | 61 |
| 10.- Hibridación de ADN..... | 62 |
| V. RESULTADOS..... | 64 |
| 1.- Aislamiento de mutantes por transposición con Tn5..... | 65 |
| 2.- Caracterización fenotípica de los mutantes alterados en el EPS..... | 65 |
| 2.1.- Morfología de la colonia..... | 66 |
| 2.2.- Producción del EPS..... | 66 |

| | <u>Pág.</u> |
|---|-------------|
| 2.3.- Análisis de la composición del EPS por cromatografía líquida de alta resolución.. | 68 |
| 2.4.- Determinación cuantitativa de los azúcares del EPS por cromatografía de gas-líquido.. | 76 |
| 2.5.- Ensayo de la nodulación..... | 76 |
| 3.- Estudio del número de copias de Tn5 en los transconjugantes obtenidos..... | 84 |
| 4.- Complementación de mutantes con cósmidos portadores de genes <i>exo</i> de <i>R. meliloti</i> | 90 |
| 4.1.- Análisis de la morfología de la colonia de los transconjugantes obtenidos..... | 90 |
| 4.1.1.- Producción del EPS de los mutantes complementados..... | 96 |
| 4.1.2.- Ensayo de nodulación de los mutantes complementados..... | 100 |
| 4.1.3.- Análisis por C.L.A.R. de los mutantes complementados..... | 116 |
| 5.- Selección de mutantes complementados por la planta hospedadora..... | 116 |
| 5.1.- Reaislamiento de nódulos..... | 124 |
| VI. DISCUSION..... | 138 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 155 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA..... | 157 |

I INTRODUCCION

1. LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

El nitrógeno, tras el carbono, oxígeno e hidrógeno, es el elemento más abundante de la materia viva, de la que constituye un 8-16 %. Forma parte de moléculas de muy importante actividad biológica, tales como ácidos nucleicos, proteínas y enzimas.

Los microorganismos y plantas utilizan comúnmente el nitrógeno en forma inorgánica (nitratos, amonio, etc.), el cual se encuentra en baja concentración en la mayoría de los suelos, siendo dicha concentración por tanto un factor limitante en el desarrollo de los vegetales, a pesar de la abundancia en nitrógeno molecular que existe en la naturaleza. En este contexto es donde cabe apreciar la importancia fundamental que posee la fijación de nitrógeno, es decir, el paso de nitrógeno molecular atmosférico a forma combinada (Sevillano y Rodríguez-Barrueco, 1987).

La fijación de nitrógeno se puede realizar a través de tres rutas: fijación espontánea, industrial y biológica, proporcionando esta última aproximadamente el 64 % de la fijación total anual, porcentaje que supone una cantidad de nitrógeno suficiente como para asegurar el buen rendimiento y crecimiento de las plantas, haciendo innecesario el uso de fertilizantes nitrogenados artificiales, de muy alto coste y que además terminarían por romper el balance del ecosistema.

La fijación biológica de nitrógeno es por tanto la mayor

fuerza de nitrógeno combinado aprovechable de la biosfera y es llevada a cabo exclusivamente por organismos procariotas (Postgate, 1982), libres o en asociación con plantas superiores.

Los microorganismos fijadores en vida libre producen poco rendimiento, ya que consumen gran cantidad de energía, difícil de obtener por escasear los sustratos necesarios en el medio circundante. Sólo las cianobacterias por ser diazótrofos fotosintéticos obtienen un rendimiento considerable. Respecto al requerimiento de oxígeno de estos microorganismos, podemos incluir en este grupo tanto aerobios (*Azotobacter*), como anaerobios (*Clostridium*) y anaerobios facultativos (*Bacillus* y *Klebsiella*), si bien estos últimos sólo fijan en ausencia de oxígeno libre.

Los microorganismos diazotróficos en asociación con plantas son la principal fuente de obtención de nitrógeno asimilable. Estas asociaciones van desde la rizocenosis con cereales hasta las asociaciones mutualistas que conllevan la formación de estructuras especializadas en raíz, tallo u hojas.

En la Tabla I aparecen algunos de los ejemplos más significativos, por su interés agrícola y forestal, de microorganismos fijadores en asociación con plantas.

De todas estas asociaciones, por su importancia en la agricultura y por tanto en la economía, la más estudiada y en la que nos centraremos en el presente trabajo es la asociación *Rhizobium*-leguminosa.

TABLA I Relación de microorganismos fijadores en asociación con plantas superiores.

| Tipo de asociación | Género | Tipo de planta | Localización del microorganismo |
|--------------------|---|----------------------------|---------------------------------|
| Rizocenosis | <i>Azospirillum</i> <i>Azotobacter</i> | Gramineas | Zona de la raíz |
| Simbiosis | <i>Rhizobium</i> | Leguminosas | Nódulo radical |
| Simbiosis | <i>Frankia</i> | Arboles y arbustos (Aliso) | Nódulo radical |
| Simbiosis | Algunas cianobacterias | Hongos ascomicetos | Talo de liquen |
| Simbiosis | <i>Nostoc</i> | Hongos, musgos, etc | Variable |
| Simbiosis | <i>Anabaena</i> | Helecho <i>Azolla</i> | Cavidad foliar |

2. TAXONOMIA

La familia Rhizobiaceae, según la 1ª edición del Manual de Bergey, incluye bacilos sin endosporas, móviles por un flagelo polar o subpolar, o bien por flagelos peritricos en número de dos a seis. Son aerobios y Gram negativos.

Todas las especies salvo *Agrobacterium radiobacter* producen hipertrofias corticales en las plantas.

En la Tabla II, se muestran los géneros pertenecientes a esta familia.

En la actualidad, esta clasificación se ha modificado en base a características tales como homología de ácidos nucleicos, hibridación, electroforesis de proteínas celulares, serología, composición de polisacárido extracelular y transferencia de la infectividad mediante plámidos.

En la Tabla III se refleja la relación de especies bien caracterizadas que comprenden estos géneros. Dicha tabla se ha elaborado a partir de las siguientes fuentes bibliográficas: la Lista de bacterias aceptadas (Skerman y col., 1989), su suplemento (Moore y Moore, 1989) y los trabajos que con posterioridad al 01/01/1989 se han publicado en la revista *International Journal of Systematic Bacteriology*.

TABLA II Géneros pertenecientes a la familia Rhizobiaceae
atendiendo al Manual de Bergey 1ª edición.

I.- Formadoras de nódulos en raíces de leguminosas. Fijadoras de nitrógeno.

a) Crecimiento rápido en medio con manitol y extracto de levadura.

G. Rhizobium

b) Crecimiento lento en medio con manitol y extracto de levadura.

G. Bradyrhizobium

II.- No formadoras de nódulos pero sí de otras hipertrofias corticales. No fijadoras.

G. Agrobacterium

III.- Formadoras de nódulos en hojas de las familias Myrsinaceae y Rubiaceae. ¿Fijadoras?

G. Phyllobacterium

TABLA III Relación de especies que comprenden los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*.

| Género Especie | Hospedador Habitual |
|---|--|
| <i>Rhizobium</i> | |
| <i>R. meliloti</i> | <i>Medicago</i> (alfalfa), <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> * |
| <i>R. leguminosarum</i> | |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | <i>Phaseolus</i> (judía, frijol) |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> | <i>Pisum</i> (guisante), <i>Vicia</i> (arveja), <i>Lathyrus</i> , <i>Len</i> (lenteja) * |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>Trifolium</i> (trébol) |
| <i>R. loti</i> | <i>Lotus</i> |
| <i>R. galegae</i> | <i>Galega</i> |
| <i>Bradyrhizobium</i> | |
| <i>B. japonicum</i> | <i>Glycine</i> (soja) |
| <i>Sinorhizobium</i> | |
| <i>S. fredii</i> | <i>Glycine</i> (soja) |
| <i>S. xinjiangensis</i> | <i>Glycine</i> (soja) |
| <i>Azorhizobium</i> | |
| <i>A. caulinodans</i> | <i>Sesbania</i> |

* Las estirpes de la misma especie pueden nodular uno o varios de los hospedadores descritos.

Género *Rhizobium* (Jordan, 1984)

Incluye bacilos pleomórficos en condiciones adversas de cultivo, Gram negativos, móviles, aeróbios (donde el oxígeno actúa como aceptor final de electrones), cuyas colonias tienen 2-3 mm de diámetro tras 3-4 días de crecimiento. Estos microorganismos producen reacciones ácidas en medio mineral con manitol u otras fuentes de carbono y su crecimiento en medios con hidratos de carbono va acompañado por producción de grandes cantidades de exopolisacárido.

Los representantes de este género penetran en las raíces de leguminosas de zonas templadas o tropicales y provocan la aparición de nódulos. Las bacterias se encuentran, en los nódulos, en forma pleomórfica (bacteroides) que es la encargada de fijar nitrógeno.

3. INTERACCION *RHIZOBIUM*-PLANTA.

Las especies del género *Rhizobium*, establecen simbiosis con leguminosas de forma específica (*Rhizobium* infecta selectivamente a la planta hospedadora). Esta simbiosis aporta beneficios mutuos que se traducen en la fijación simbiótica de nitrógeno por la planta y la persistencia del microorganismo en la naturaleza. Tanto la planta como la bacteria son incapaces de fijar nitrógeno como organismos independientes.

El establecimiento de la simbiosis está perfectamente

regulada por los simbioses, y consta de varias etapas.

3.1. Colonización y adhesión a la raíz

El proceso comienza con la colonización del pelo radical por parte del microorganismo, que es atraído por la planta debido a sustancias que ésta segrega (triptófano) y que *Rhizobium* puede transformar (Bauer y col., 1981; Dart, 1977; Vincent, 1980).

Tras la colonización, la bacteria se adhiere específicamente a los pelos radicales.

3.2. Curvatura del pelo radical

Una vez llegado a esta etapa, y en respuesta a compuestos específicos (flavonoides) exudados por la planta, los genes de la nodulación de *Rhizobium* van a inducir la curvatura de los pelos radicales y la división de las células meristemáticas del córtex interno.

3.3. Infección

Al curvarse el pelo radical se produce una zona de tensión que provoca el debilitamiento de la pared celular vegetal, facilitándose de esta forma la penetración de *Rhizobium* al interior del pelo radical (Abe y col., 1980; Bauer, 1981).

A partir de este punto en el que se inicia la

penetración comienza la formación de una estructura especializada, denominada cordón de infección, en cuyo interior se multiplican las bacterias y que avanza desde las células del pelo radical hacia el cortex de la raíz, donde empieza a ramificarse. Hay que decir que las paredes del cordón de infección son sintetizadas por la planta.

3.4. Desarrollo del nódulo

A partir del cordón de infección, las bacterias comienzan a invadir las células vegetales en división y empiezan a desarrollar una membrana peribacteroidal alrededor de sí mismas y en el interior de las células vegetales, las cuales detienen su división (Libbenga y col., 1974; Newcomb, 1980).

Las células adyacentes al cordón que no han sido invadidas por la bacteria forman un meristemo apical; algunas de las células producidas por esta actividad meristemática son invadidas por el cordón de infección, mientras que el resto produce un nuevo cortex y haces vasculares. Esta actividad continúa hasta que está perfectamente definido el nódulo cortical, que recibe el aporte vascular de la estela (Dart, 1977).

Durante el desarrollo y mantenimiento del nódulo, genes específicos de bacterias y plantas son expresados de forma coordinada a lo largo del tiempo. Las proteínas específicas del nódulo se producen debido a la desrepresión de ciertos

genes de la planta, incluyendo el gen que sintetiza la parte proteica de la molécula de leghemoglobina (Legocki y col., 1980), fundamental para la regulación de los niveles de tensión de oxígeno dentro del nódulo. El microsimbionte por su parte sintetiza la parte hemo de la molécula anteriormente citada (Dilworth y col., 1979; Leong y col. 1982)

3.5. Diferenciación de bacteroides y fijación de nitrógeno

Además de cambios en la regulación de los genes del microorganismo, se producen cambios bioquímicos y morfológicos esenciales. La bacteria deja de dividirse, pierde su pared celular, se vuelve pleomórfica y adquiere el estado de "bacteroide". Los bacteroides pueden entonces fijar el nitrógeno atmosférico, utilizando ciertos compuestos que provienen de la planta como fuente de energía.

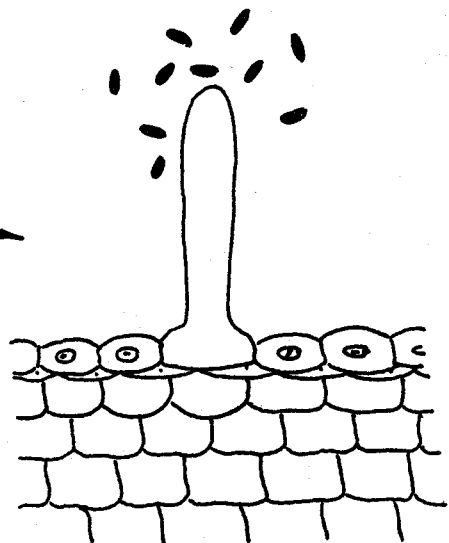
En la Figura 1 aparece un esquema en el que se describe el proceso de infección (Sprent, 1989).

4. GENÉTICA DE *RHIZOBIUM*

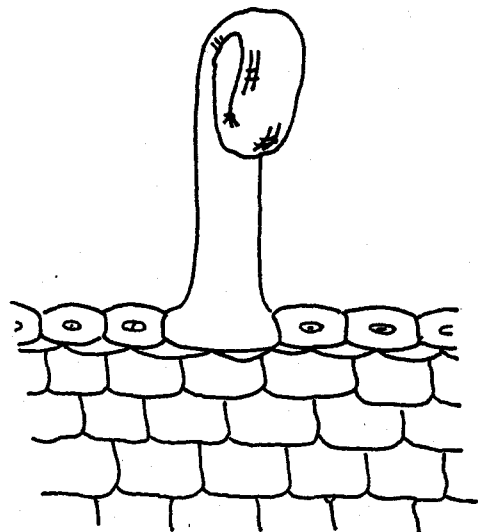
Para que el proceso de fijación de nitrógeno se lleve a cabo es necesario la intervención de una serie de genes, tanto de la planta como del microsimbionte. A partir de distintos mutantes de *Rhizobium* se han podido aislar e identificar estos genes así como determinar su localización.

Los genes de la bacteria involucrados en todo este

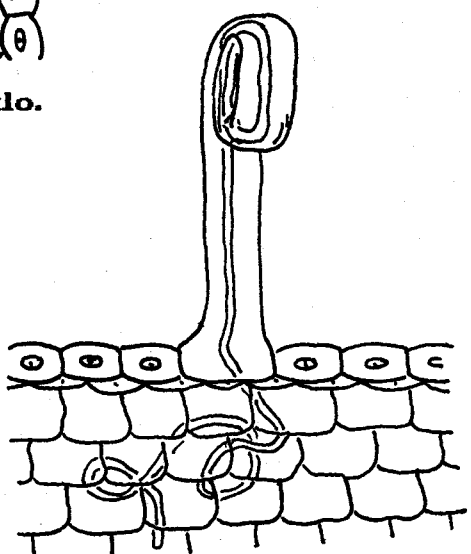
Figura 1.- Proceso de infección.



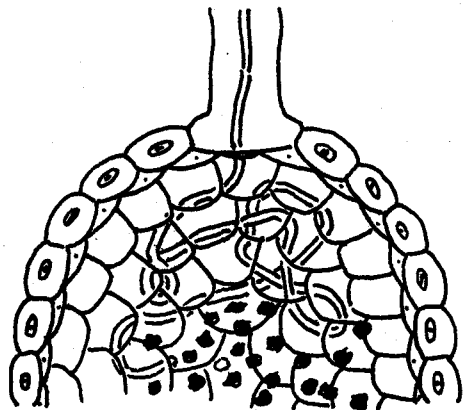
1. Conjugación y adhesión.



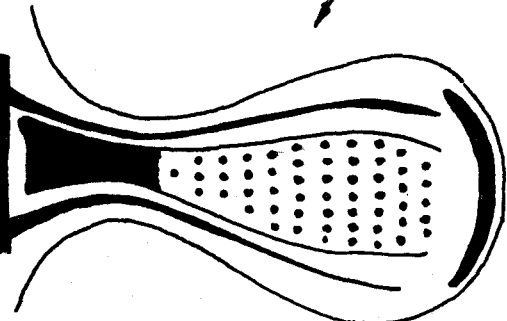
2. Curvatura del pelo radical.



3. Cordón de infección.



4. Desarrollo del nódulo.



5. Diferenciación de bacteroides y fijación del nitrógeno.

proceso pueden incluirse en dos grandes grupos: genes tempranos, que son aquellos genes necesarios para inducir la formación de la estructura del nódulo; y genes tardíos, que son aquellos cuya expresión determina la capacidad de fijar nitrógeno en las estructuras nodulares.

En las distintas especies de *Rhizobium* la mayoría de los genes responsables de la nodulación y fijación de nitrógeno están localizados en plásmidos de alto peso molecular, llamados plásmidos simbióticos (pSym) (Banfalvi y col., 1981; Brewin y col., 1980; Higashi, 1967; Hooykaas y col., 1981; Nuti y col., 1979; Prakash y col., 1981). Otros genes están localizados en otros plásmidos e incluso en el cromosoma bacteriano.

En la Tabla IV se esquematizan las funciones simbióticas encontradas en el genoma de *Rhizobium* (Dylan y col., 1986; Finan y col., 1985; Geremia y col., 1987; Horvath y col., 1986; Leigh y col., 1987).

En el presente trabajo nos centraremos en el estudio de mutantes que presentan alteraciones en la síntesis y producción del exopolisacarido bacteriano, que parece jugar un papel importante en el proceso de infección ya que participa activamente en el reconocimiento específico entre los dos simbiosomas.

TABLA IV Estructura del genoma de *Rhizobium*

| Genes | Etapas que intervienen | Localización | Mutantes | Fenotipo |
|--------------------------|---|--|------------------|--|
| <u>nod</u> comunes | inducción del nódulo | plásmido sym | Nod ⁻ | ausencia de nódulos |
| <u>nod</u> específicos | | | | |
| <u>exo</u> | síntesis de EPS. Adhesión y especificidad | plásmido sym otros plásmidos, cromosoma | Exo ⁻ | nódulos vacíos no fijadores. No curvatura del pelo radical ni cordón de infección. |
| <u>ndv</u> | desarrollo del nódulo y cordón de infección | cromosoma | Ndv ⁻ | nódulos vacíos, no cordón de infección. No fijadores. |
| <u>fix</u> <u>nif</u> | maduración del nódulo. Fijación del nitrógeno | plásmido sym, otros plásmidos, cromosoma | Fix ⁻ | nódulos no fijadores. |

5. ESTUDIO DEL EXOPOLISACARIDO BACTERIANO

5.1. Estudio genético

Las bacterias del G. *Rhizobium*, al igual que otras bacterias Gram negativas producen una gran variedad de polisacáridos superficiales tales como exopolisacáridos ácidos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) y glucanos neutros (β -1,2-glucanos) (Halverson y col., 1986). Estos polisacáridos tienen un papel esencial en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, si bien aún no se ha podido asignar con plena seguridad la función específica que tienen. Entre las funciones que se les atribuyen podemos citar:

- 1) Protección del microsimbionte de las respuestas de defensa de la planta.
- 2) Señal para la planta, bien en forma de molécula de alto peso molecular o bien como oligosacáridos.
- 3) Reconocimiento de los pelos radicales susceptibles de ser infectados.
- 4) Transporte de enzimas extracelulares.
- 5) Soporte, para mantener la presión osmótica apropiada durante el proceso de infección.
- 6) Forman parte de la matriz del tubo de infección.

Parece ser que los polisacáridos no son los únicos responsables de la especificidad del microsimbionte por el hospedador. Así pues, mutantes con ausencia de ciertos polisacáridos, si bien forman nódulos vacíos (mutantes Inf⁻)

no tienen alterados el rango de hospedador (Finan y col., 1985).

Se ha demostrado que mutaciones en la síntesis de EPS pueden producir distintos efectos en la nodulación ya que se han aislado mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viceae* con fenotipos muy variados (Sanders y col., 1981), e igualmente se ha descrito para las biovariedades *phaseoli* y *trifolii* de *R. leguminosarum*, y *R. meliloti*. En estas cepas se han aislado mutantes con alteración en el EPS que son incapaces de producir la curvatura del pelo radical y desarrollar el cordón de infección, mientras que otros mutantes EPS de las mismas cepas son capaces de curvar el pelo e iniciar la formación del cordón, aunque tampoco fijan nitrógeno (Chakravorty y col., 1982; Leigh y col., 1985; Pühler y col., 1986; Vandenbosch y col., 1985).

Leigh y col., en 1985 y posteriormente Long y col., en 1988, llegaron a identificar 12 grupos de complementación que afectan a la producción del EPS en *R. meliloti*. Estos grupos de genes están localizados en el megaplásmido 2 de *R. meliloti* (Finan y col., 1986).

Los mutantes ExoA, ExoB, ExoF, ExoL, ExoM, ExoP, ExoQ y ExoT no producen polisacáridos, presentando un fenotipo Nod⁺ Inf⁻. Los mutantes ExoG, ExoJ y ExoN producen menos EPS que la cepa silvestre. Estos mutantes presentan fenotipo Fix⁺ si bien ExoG y ExoJ tienen menor eficacia fijadora.

Mutantes ExoH producen la misma cantidad de exopolisacárido que la cepa silvestre pero también forman

nódulos Inf⁻ Fix⁻. Son capaces de curvar el pelo radical pero los cordones de infección abortan en el cortex externo del nódulo. El EPS de estos mutantes carece de succinato (Leigh y col., 1987) de lo que se deduce la relación existente entre la presencia de succinato en la estructura EPS y la invasión y posiblemente el desarrollo del nódulo. Por otro lado, Müller y col. (1988) han encontrado mutantes Inf⁻ de *R. meliloti* cuyo EPS carece de piruvato.

Por lo indicado anteriormente, se evidencia la importancia que tienen las sustituciones no sacarídicas del EPS, que varía, por otro lado, dependiendo de la ausencia o presencia del plásmido simbiótico (Carlson y col., 1986; Skornpska y col., 1985).

En *R. meliloti* se han encontrado otros 4 genes *exo* localizados en el cromosoma, *exoC*, *exoD*, *exoR* y *exoS*, teniendo los dos últimos un papel regulador actuando sobre la transcripción o traducción de los genes *exo* (Doherty y col., 1988), y por último Zhan y col., en 1990 han descrito otro nuevo gen regulador en *R. meliloti*, el gen *exoX*, que no parece regular la expresión de *exoP*. Mutantes *ExoX* de *R. meliloti* producen niveles elevados de succinoglicano. El efecto del gen *exoX* se compensa con otro gen de *R. meliloti*, el gen *exoF*.

En otras especies de *Rhizobium* tales como *R. leguminosarum* bv. *trifolii* o *Rhizobium* sp NGR234, los mutantes con deficiencia en la síntesis de EPS forman nódulos inefectivos (Fix⁻) pero a diferencia de *R. meliloti* son

capaces de iniciar el proceso de infección, aunque los cordones de infección degeneran muy pronto (Chakravorty y col., 1982; Chen y col., 1985).

Varios autores han postulado que en las interacciones microorganismos patógenos-plantas, los oligosacáridos específicos derivados de pared celular del microorganismo o de la planta hospedadora actúan como reguladores de determinadas funciones de la planta, tales como crecimiento, diferenciación y resistencia a enfermedades (Darvill y col., 1984; Keim y col., 1985). La actividad biológica del EPS dependería de la presencia de enzimas de la planta que degradarían el polímero en oligosacáridos activos con un papel específico en el proceso de infección (Dazzo y col., 1982; Solheim y col., 1984).

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, no se puede asegurar que el EPS juegue un papel activo o pasivo en la interacción de la bacteria con la planta, ya que ambos casos son posibles (Djordjevic y col., 1987b).

El hallazgo del papel del exopolisacárido en el proceso de nodulación se ha complicado aún más al encontrarse un mutante EPS de *R. leguminosarum* que produce distintos efectos simbióticos según la leguminosa que infecte (Borthakur y col., 1986). Asimismo se han aislado mutantes EPS de *Rhizobium* sp NGR234 que tiene un rango de hospedador efectivo más reducido que la cepa silvestre (Chen y col., 1985).

Glazebrook y col. (1989) han encontrado que la estirpe 1021 de *R. meliloti* tiene la capacidad críptica de producir

un nuevo EPS (EPSII), que a diferencia del EPS estudiado hasta ahora (EPSI) no tiene la propiedad de unirse al calcofluor. Para que se produzca este EPSII es necesario una mutación cromosómica (*expR*). Mutaciones cromosómicas en *expR* originan la síntesis del EPSII. Se han identificado seis grupos de complementación (genes *expA*, *expC*, *expG*, *expD* y *expE*) cuya transcripción es regulada por el gen *expR* localizado en el megaplásmido 2 de *R. meliloti*, que son necesarios para la síntesis de EPSII además del producto génico *exoB*, involucrado también en la síntesis del EPSI y de los lipopolisacáridos (Leigh y col., 1985).

Los resultados de Glazebrook y Walker indican que los EPS juegan un papel importante en el fenómeno de especificidad por el hospedador, ya que la síntesis del EPSII corrige el fenotipo Inf⁻ de mutantes EPSI. Así, los dobles mutantes *expR exoA* de *R. meliloti* forman nódulos efectivos en *Medicago sativa*, pero la mutación *expR* no corrige el fenotipo Inf⁻ para las otras legumbres que generalmente nodulan con *R. meliloti* (*Trigonella*, *Melilotus*, *Medicago truncatula*). Esto ha demostrado que EPSI es necesario para la infección de algunas leguminosas pero no para otras. Esto nos pone de manifiesto que es la propia planta hospedadora la que determina que caracteres estructurales del EPS son importantes para el establecimiento de la simbiosis.

Otra función que ha sido propuesta para los EPS es servir como señales para la planta durante el proceso de

desarrollo nodular, por ejemplo induciendo la síntesis de nodulinas (Leigh y col., 1987).

Aunque en general los plásmidos simbióticos no son necesarios para la producción de los EPS, Borthakur y col. en 1985 encontraron dos genes (*psi* y *psr*) que están localizados en el pSym de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y que afectan a la síntesis de EPS en el nódulo (los bacteroides apenas sintetizan EPS).

La transcripción del *psi* está regulada por el gen *psr* que parece que regula también la transcripción de otros genes cuya expresión depende del estado libre o simbiótico en que se encuentra la bacteria.

Finalmente, a partir de un trabajo publicado por Appelbaum y col. (1988) han puesto de manifiesto la conexión existente entre los genes de la nodulación (genes *nod*) y la estructura superficial de la bacteria ya que se ha encontrado que una de las copias del gen *nodD* de *Sinorhizobium fredii* USDA191 inhibe la síntesis de EPS cuando se encuentra clonada en multicopia.

5.2. Estructura del EPS ácido de *Rhizobium*

Los polisacáridos bacterianos forman un grupo de polímeros con gran cantidad de variaciones estructurales y que frecuentemente incluyen como compuestos azúcares inusuales.

Entre los monosacáridos más frecuentes en el

polisacárido de *Rhizobium* podemos citar: D-ribosa, D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosamina, D-galactosamina, ácido glucurónico y ácido galacturónico, así como sus derivados metilados. Con respecto a los sustituyentes no glicosídicos podemos citar: ácido acético, ácido pirúvico, ácido succínico y ácido hidroxibutanoico.

En relación al exopolisacárido ácido objeto de nuestro estudio, según Zevenhuizen (1971, 1981) en las especies de *Rhizobium* existen dos tipos de EPS; uno que lo presentan la mayoría de las estirpes de *R. meliloti* y que contiene D-glucosa, D-galactosa y ácido pirúvico en la proporción 7:1:1, y otro tipo de EPS que lo presentan las tres biovariedades de *R. leguminosarum* y que contiene D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico y ácido pirúvico en las proporciones 5:1:2:2.

Por su parte, Mc Neil y col. (1986) han encontrado que el primer tipo de EPS propio de *R. meliloti* puede tener sustituciones de tipo succinato y acetato, y Sánchez del Junco (1990) describe que en la cepa CIAT899 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* el EPS carece de ácidos urónicos y contiene ácido acético (6:2:1,5:1,5).

A pesar de lo anteriormente expuesto, en general parece cumplirse que diferentes cepas de una misma especie de *Rhizobium* excretan aparentemente los mismos polisacáridos, mientras que cepas diferentes de distintas especies del mismo género excretan polisacáridos estructuralmente distintos (Dudman y col., 1983).

De los sustituyentes de tipo no carbohidratos que aparecen en el EPS de *Rhizobium* los más comunes son ácido pirúvico, ácido acético, ácido succínico y ácido 3-hidroxibutanoico.

El ácido pirúvico se encuentra enlazado como grupo cetal en posiciones 4 y 6 de galactosa y glucosa en los polisacáridos de *Rhizobium*. Los sustituyentes o-acilos, por su parte, pueden estar presentes o no en cualquier posición de cualquier residuo glicosídico de los polisacáridos.

Ya en 1969, Dudman y Heidelberger afirmaron que estos dos tipos de sustituyentes eran determinantes inmunológicos en el exopolisacárido de *Rhizobium*. Más tarde, Mort y Bauer (1980) han demostrado que el contenido en sustituyentes acilo y pirúvico varía con el tiempo de cultivo de las células bacterianas.

En cuanto a la cepa que nos compete, en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla se han realizado estudios sobre la estructura del EPS de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899 y se han llegado a las siguientes conclusiones:

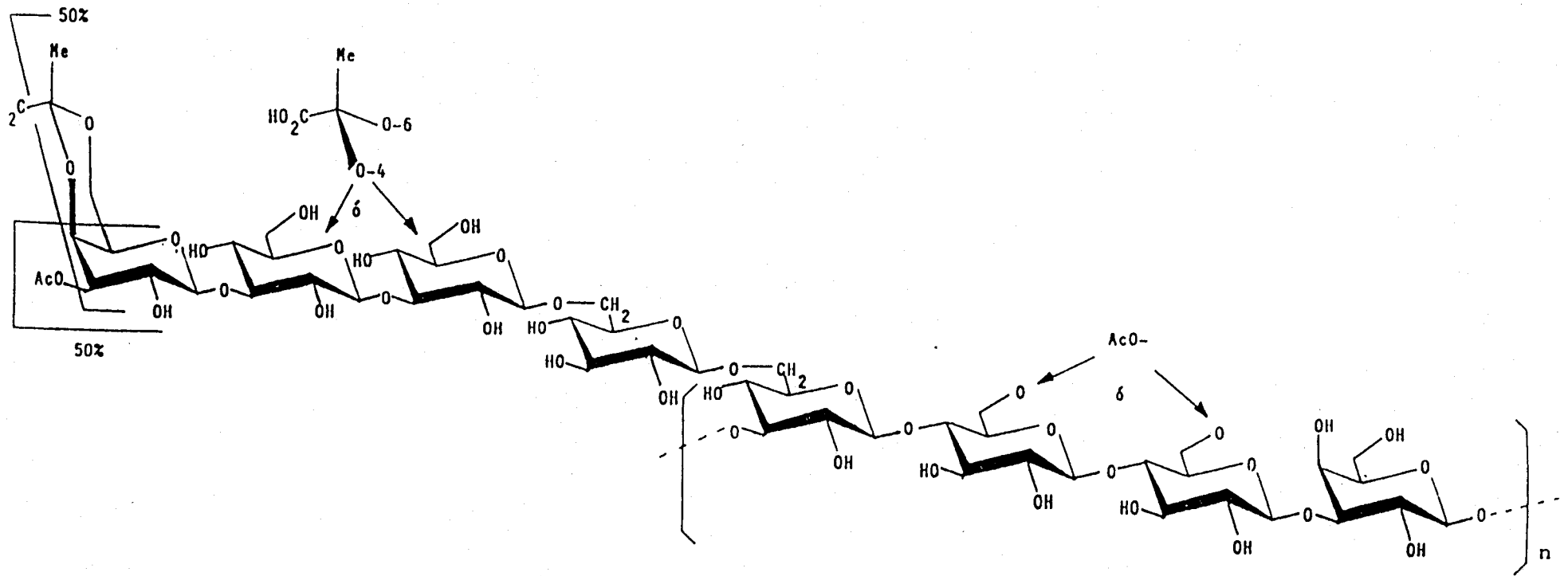
- 1) Mediante análisis cualitativo por cromatografía líquida de alta resolución (C.L.A.R.) se han identificado los siguientes componentes en el polisacárido: glucosa, galactosa, piruvato y acetato.
- 2) Para la determinación cuantitativa de los azúcares se realizó la cromatografía de gas-líquido de los correspondientes acetatos de alditoles, y se

determinó que la glucosa y galactosa se encontraban en razón molar de 3:1.

- 3) La determinación cuantitativa de los sustituyentes se realizó por métodos colorimétricos. Como la unidad de repetición del polisacárido está constituida por ocho azúcares, podemos expresar la cantidad de sustituyentes en moles por unidad de repetición del polisacárido encontrándose así el piruvato en una concentración de 1,5 moles de piruvato por unidad de repetición del polisacárido y el acetato en una concentración de 1,3 moles por unidad de repetición del EPS.

En la Figura 2 se refleja la estructura final del EPS de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899. (Gil-Serrano y col., 1990).

Figura 2.- Estructura de la molécula del
EPS de *R. leguminosarum* bv.
phaseoli CIAT899.



II OBJETIVOS

La excrección de polisacáridos bacterianos es fundamental en el proceso de infección del microorganismo a la planta, ya que aunque no se conozca con exactitud su papel específico, si queda demostrado que interviene o puede intervenir de distintas formas en el proceso de nodulación.

El objetivo del presente trabajo es el de aislar y caracterizar mutantes con alteraciones en la síntesis del exopolisacárido de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899 y estudiar las características fenotípicas que presentan.

Para el desarrollo de estos objetivos, se siguió la siguiente estrategia:

- 1) Mutagénesis al azar con Tn5::*mob* y obtención de mutantes en el exopolisacárido.
- 2) Estudio de la producción del exopolisacárido y determinación de la composición cualitativa y cuantitativa.
- 3) Ensayo de las propiedades simbióticas de los mutantes.
- 4) Complementación de las alteraciones en el exopolisacárido mediante cósmidos *exo* de *Rhizobium meliloti*.

III MATERIAL

1. MICROORGANISMOS

Las cepas y plásmidos usados en el presente trabajo se citan en la Tabla V, especificando su procedencia y sus características más relevantes.

2. PLANTAS

Phaseolus vulgaris variedad Negro Jamapa (frijol)

3. ANTIBIOTICOS

Se emplearon en el medio de cultivo, a las concentraciones finales que se indican en la Tabla VI.

Se disolvieron en agua destilada. Se esterilizaron por filtración utilizando membrana Millipore de 0,45 micras de diámetro de poro. La rifampicina y tetraciclina se disolvieron en metanol y etanol-agua al 50% (V/V) respectivamente y se añadieron directamente al medio de cultivo.

Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA.

4. MEDIOS DE CULTIVOS

TABLA V Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Procedencia |
|--|--|------------------------------|
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> | | |
| CIAT899 | cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R | E. Martínez y col. (1985) |
| RSP1MJ | 899::Tn5::mob Nod ⁻ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP4MJ | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP9MJ | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP10MJ | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁺ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP21MJ | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP25MJ | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP29MJ | 899::Tn5::mob Nod ⁻ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP30MJ | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |

.../...

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Procedencia |
|-------------------|---|--------------|
| RSP44MJ | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R | Este trabajo |
| RSP1MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ⁻ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP1MJ-15P | 899::Tn5::mob Nod ⁻ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD15 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP1MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ⁻ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP4MJ-2 | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP4MJ-2P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP4MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP4MJ-15P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD15 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |

.../...

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Procedencia |
|-------------------|---|--------------|
| RSP4MJ-34 | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP4MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP9MJ-2P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP9MJ-5 | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP9MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP9MJ-15P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD15 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP9MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |

.../...

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Procedencia |
|-------------------|---|--------------|
| RSP10MJ-2P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP10MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP10MJ-15P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD15 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP10MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP21MJ-2P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP21MJ-5 | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP21MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |

.../...

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Procedencia |
|-------------------|--|--------------|
| RSP21MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP29MJ-2P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP29MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP29MJ-15P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD15 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP29MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP30MJ-2P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP30MJ-5 | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁺ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |

.../...

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Procedencia |
|-------------------|--|--------------|
| RSP30MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP30MJ-15P | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP30MJ-34 | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP30MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP44MJ-2P | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD2 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP44MJ-5 | 899::Tn5::mob Nod ⁺ Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| RSP44MJ-5P | 899::Tn5::mob Nod ^{+/-} Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD5 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |

.../...

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Procedencia |
|-------------------|---|----------------------|
| RSP44MJ-34P | 899::Tn5::mob Nod ⁺ /- Fix ⁻ Rif ^R Km ^R Tc ^R , portador del cósmido pD34 de <i>R. meliloti</i> | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> | | |
| HB101 | <i>hsdS</i> , <i>hsdM</i> , <i>pur</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>gal</i> , <i>lacY</i> , <i>recA</i> , <i>str</i> | G. Ditta (1986) |
| pSUP5011 | Tn5::mob Km ^R Nm ^R | R. Simon (1983) |
| pRK2073 | "helper" Sp ^R | G. Ditta (1986) |
| pD34 | Cósmido derivado del pLAFR1 porta- dor del gen <i>exoA</i> de <i>R. meliloti</i> | J.A. Leigh (1985) |
| pD2 | Cósmido derivado del pLAFR1 porta- dor del gen <i>exoB</i> de <i>R. meliloti</i> | J.A. Leigh (1985) |
| pD15 | Cósmido derivado del pLAFR1 porta- dor del gen <i>exoC</i> de <i>R. meliloti</i> | J.A. Leigh (1985) |
| pD5 | Cósmido derivado del pLAFR1 porta- dor del gen <i>exoD</i> de <i>R. meliloti</i> | J.A. Leigh (1985) |

TABLA VI Concentraciones finales de antibióticos usados en el medio de cultivo

| <u>ANTIBIOTICO</u> | <u>CONCENTRACION</u> |
|-----------------------------------|----------------------|
| Ampicilina | 100 |
| Cloranfenicol | 50 |
| Espectinomicina | 15 |
| Kanamicina | 50 |
| Nalidíxico | 10 |
| Rifampicina | 25 |
| Tetraciclina (<i>E. coli</i>) | 15 |
| Tetraciclina (<i>Rhizobium</i>) | 10 |

* Las concentraciones se expresan en microgramos/ml

4.1. MEDIO TY

Se utilizó como medio base para el crecimiento de *Rhizobium* tanto en medio líquido como sólido, con la siguiente composición (Beringer y col., 1974):

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Triptona | 5,00 g |
| Extracto de levadura | 3,00 g |
| CaCl ₂ . 6H ₂ O | 0,84 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó en autoclave durante 20 min. a 121 °C.

El medio sólido se realizó añadiendo agar (Pronadisa) a la concentración final de 1,2%.

4.2. MEDIO LB

Los cultivos de *Escherichia coli* se han llevado a cabo en medio LB (Maniatis y col., 1982), cuya composición es la siguiente:

| | |
|-----------------------|---------|
| Triptona | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó en autoclave durante 20 min. a 121 °C.

El medio sólido se realizó añadiendo agar (Pronadisa) a la concentración final de 1,2%.

4.3. MEDIO LB CALCOFLUOR

Se utilizó el medio LB Calcofluor (Finan y col., 1985) para obtener la producción de polisacáridos por las cepas de *Rhizobium*, por iluminación con luz U.V. (onda larga), con la siguiente composición:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Triptona | 10,0 g |
| Extracto de levadura | 5,0 g |
| NaCl | 5,0 g |
| Calcofluor | 0,2 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 2 mM |
| CaCl ₂ . 6H ₂ O | 2 mM |
| Agar | 12 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor), se adquirió de Sigma Chemical Company. El medio se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 min. y posteriormente se añadió el cloruro cálcico y el sulfato magnésico.

4.4. MEDIO 79 DE ALLEN

Para la producción de polisacáridos se utilizó el medio 79 de Allen (Allen, 1951), cuya composición se detalla a continuación:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 0,60 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 0,20 g |
| CaCO ₃ | 3,00 g |
| NaCl | 0,20 g |
| Manitol | 7,60 g |
| Glucosa | 2,40 g |
| Extracto de levadura | 1,00 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó durante 20 min. a 121 °C.

Para el medio sólido se añadió agar (Pronadisa) a la concentración final 1,2%

5. SOLUCIONES NUTRITIVAS PARA PLANTAS

5.1. SOLUCIONES STOCKS

5.1.1. MICROELEMENTOS: MEDIO AUSTRALIANO

| | |
|--------------------------------|---------|
| H ₃ BO ₃ | 2,860 g |
|--------------------------------|---------|

| | |
|--|----------|
| MnSO ₄ . H ₂ O | 4,060 g |
| ZnSO ₄ . H ₂ O | 0,440 g |
| CuSO ₄ . 5H ₂ O | 0,157 g |
| (NH ₄)Mo ₇ O ₂ . 4H ₂ O | 0,020 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml. |

5.1.2. EDTA-Fe

| | |
|-----------------------|---------|
| EDTA-Fe | 3,45 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

5.1.3. CaCl₂

| | |
|---------------------------------------|---------|
| CaCl ₂ . 6H ₂ O | 10 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

5.2. SOLUCION NUTRITIVA

Utilizando los stocks anteriores se prepara la solución nutritiva para plantas cuya composición es:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Medio Australiano | 0,25 ml |
| EDTA-Fe | 0,25 ml |
| CaCl ₂ . 6H ₂ O | 5,00 ml |
| K ₂ HPO ₄ | 0,10 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 0,10 g |
| KCl | 0,10 g |

Agua destilada c.s.p. 1000 ml

El pH final de la solución es de 6,0-6,5.

6. TAMPONES

6.1. TAMPON FOSFATO

Se prepara según Gomori (1955).

Solución A: Solución 0,2 M de fosfato sódico monobásico (27,8 g/l de agua destilada)

Solución B: Solución 0,2 M de fosfato sódico dibásico (71,7 g/l de agua destilada).

Se mezclan 33 ml de solución A y 67 ml de la solución B y se diluye hasta 200 ml con agua destilada, para conseguir un pH de 7,1, ajustándose si fuera preciso. Se esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0,45 micras de diámetro de poro.

6.2. TAMPON TRIS-ACETATO

Se preparó siguiendo la técnica descrita por Maniatis (1982).

| | |
|----------------------|-------|
| Tris-acetato | 40 mM |
| AEDT Na ₂ | 1 mM |
| pH:8 | |

7. ENZIMAS E ISOTOPOS

Las restrictasas *EcoRI* y *HindIII*, fueron suministradas por Boehringer Mannheim (R.F.A.) y utilizadas según las recomendaciones de los suministradores.

El marcaje de ADN se realizó al azar según la técnica de Feinberg y Vogelstein (1983).

IV METODOS

1. CONJUGACION

En los experimentos de conjugación se partió de medios líquidos inoculados a partir de una colonia bacteriana e incubados con agitación a una temperatura de 28 °C para *Rhizobium* y de 37 °C para *E. coli*, hasta una densidad óptica de 0.8 (aproximadamente 2×10^8 bacterias/ml) a 480 nm con un espectrofotómetro Bausch y Lomb "Spectronic 20".

1.1. CONJUGACION EN MEMBRANA

Se utilizó la técnica descrita por Jacob y col. (1976), consistente en mezclar volúmenes iguales de dos cultivos, uno de células donadoras y otro de células receptoras, que contengan al menos, 10^8 células/ml. Esta mezcla se hace pasar a través de una membrana Sartorius de 0,45 micras de diámetro de poro. Posteriormente se coloca la membrana sobre un soporte de agar (TY) y se incuba a 28 °C de 20 a 24 horas. Pasado este tiempo se recoge la muestra en 5 ml de medio TY, y previa dilución, se siembra en medios selectivos para los transconjugantes y para el donador. El número real de células viables del donador se utilizará posteriormente en la estimación de la frecuencia de transferencia del plásmido que se trate.

Esta técnica de conjugación se utilizó en los experimentos de obtención de mutantes mediante transposición.

1.2. CONJUGACION EN PLACA

Esta técnica es análoga a la anterior con la diferencia de que la conjugación tiene lugar directamente sobre soporte de agar, para lo cual se depositan 0,1 ml de cada cultivo (donador, receptor y plásmido "helper" o cooperador si fuera necesario) sobre la placa de petri, teniendo cuidado de que los cultivos queden bien mezclados, a ser posible sobre una pequeña superficie de agar, de tal forma de que no se extiendan sobre toda la placa. A continuación, se incubaba a 28 °C y pasado 20-24 horas se recoge el pequeño césped formado en 5 ml de medio TY. A partir de aquí se procede tal como se describe en el apartado anterior.

Esta técnica de conjugación se utilizó en los experimentos de complementación.

2. MUTAGENESIS CON Tn5

La mutagénesis se realizó mediante conjugación según la técnica descrita en el Apartado 1.1 y que se esquematiza en la Figura 3.

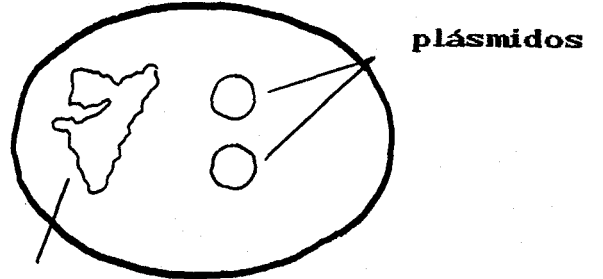
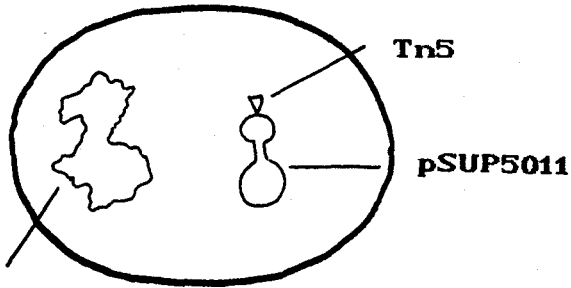
Como donador se empleó *E. coli* HB101 portadora del plásmido pSUP5011 (Figura 4) y como receptor *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CIAT899.

La selección de transconjugantes se llevó a cabo sobre medio TY adicionado de kanamicina y de los antibióticos propios de la cepa receptora.

Figura 3.- Esquema del proceso de mutagénesis.

E. coli HB101

R. Phaseoli CIAT899

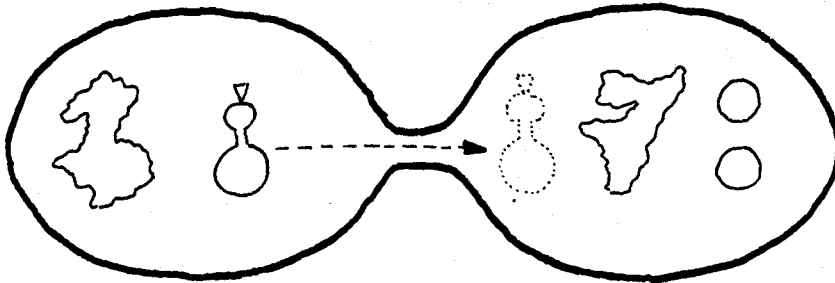


cromosoma

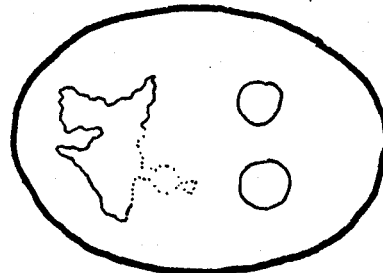
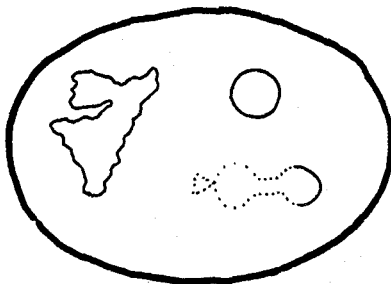
cromosoma

plásmidos

conjugación



transconjugantes Km^R



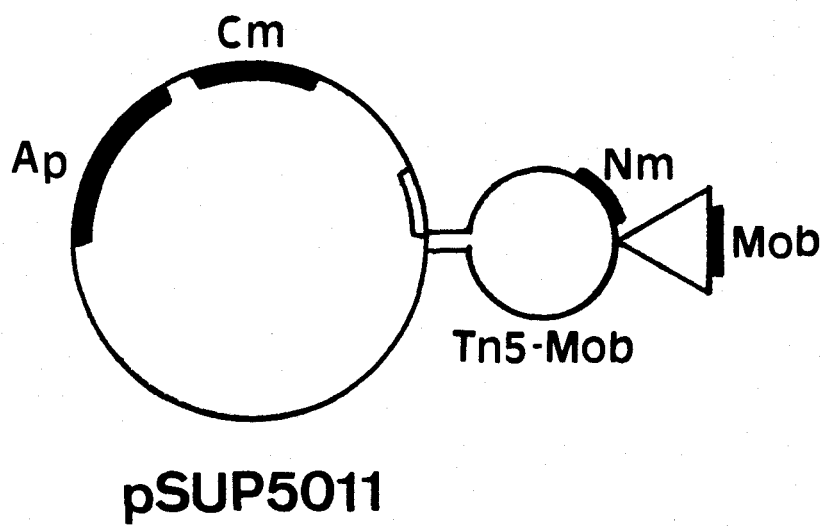


Figura 4.- Vector pSUP5011. El replicón básico es pBR325.

El recuento de las células donadoras se realizó sembrando la mezcla de la conjugación en medio LB adicionado de los antibióticos propios del mismo.

La frecuencia de transferencia del plásmido se calculó dividiendo el número de transconjugantes por el de donadores.

3. COMPLEMENTACION DE MUTANTES CON COSMIDOS PORTADORES DE GENES *EXO* DE *R. MELILOTI*.

La complementación se realizó mediante conjugación según la técnica descrita en el Apartado 1.2.

Se realizaron conjugaciones de cada mutante con cada uno de los cosmidos portadores de los genes *exo* de *R. meliloti* contenidos en la cepa *E. coli* HB101. Como cepa cooperadora se utilizó *E. coli* HB101 (pRK2073).

En la Tabla VII se muestran los donadores y receptores utilizados para la complementación.

4. ESTUDIO DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR

4.1. PRODUCCION

La producción de polisacaridos extracelulares de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CIAT899 se llevó a cabo cultivando la bacteria en matraces erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio 79 de Allen. Los matraces se inocularon con una suspensión de la cepa a estudiar que

TABLA VII Cepas empleadas en los estudios de complementación.

RECEPTORES (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*)

| | | |
|--------|---------|---------|
| RSP1MJ | RSP10MJ | RSP29MJ |
| RSP4MJ | RSP21MJ | RSP30MJ |
| RSP9MJ | RSP25MJ | RSP44MJ |

DONADORES (*E. Coli*)

| | |
|--------------|--------------|
| HB101 (pD34) | HB101 (pD15) |
| HB101 (pD2) | HB101 (pD5) |

HELPER (*E. Coli*)

HB101 (pRK2073)

contenía alrededor de 2×10^8 células y se incubaron a 28 °C durante 5 días a 200 rpm. en un agitador-incubador Lab-Line (Caviedes y col., 1982).

4.2. EXTRACCION

Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 20000 rpm. durante 20 min. en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B. Para extraer los polisacaridos se siguió la técnica descrita por Amarger y col. (1967).

Se adicionaron al sobrenadante 2 volúmenes de acetona. Se lavó el precipitado formado nuevamente con acetona. Se secó con aire caliente y se dializó frente a agua destilada a 4 °C durante 24 horas. Se volvió a precipitar con acetona. El proceso se repitió 3 veces.

4.3. PURIFICACION

Entre los métodos descritos sobre precipitación con sales de amonio cuaternario se eligió el de Scott (1965) desarrollado por Valent y col. (1980).

Al exopolisacárido disuelto en agua se le añade sulfato sódico anhidro y se agita a temperatura ambiente durante una noche. Se añade Cetavlon (Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetil amonio) al 10% acuoso hasta precipitación del polisacárido. Se centrifuga, se lava con agua y se disuelve con cloruro sódico al 10%. Se precipita con 2 volúmenes de acetona y el

precipitado se redisuelve en cloruro sódico al 10%. Se dializa frente a una disolución acuosa de cloruro sódico al 1% durante 24 horas y posteriormente frente a agua destilada durante el mismo tiempo. Finalmente se liofiliza.

4.4. ANALISIS

La concentración de polisacárido deseada se disolvió en agua destilada, y se añadió ácido sulfúrico concentrado en la cantidad necesaria para que quedase a una concentración 1 Normal. A continuación se hidrolizaron por calentamiento a reflujo durante 11 horas. Pasado este tiempo se eliminó el ácido sulfúrico por adición de carbonato de bario hasta que el pH de la mezcla se hizo igual a 7. El precipitado formado se separó por filtración en Millipore. La solución recogida se concentró a vacío hasta sequedad y el residuo seco se disolvió en agua destilada para su análisis por cromatografía.

4.4.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Para la realización de este estudio se utilizó un cromatógrafo Sugar Analyzer I Waters Associated Inc, provisto de un inyector de volumen fijo de 20 microlitros, una bomba de alta presión modelo M510 y un detector de índice de refracción R401. Se utilizó la columna Aminex ión exclusión HPX-87 H (Biorad).

Se trabajó a 65 °C. El eluyente utilizado fue ácido sulfúrico 0,015 N. La velocidad de flujo fué de 0,3 ml/min.

4.4.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE AZUCARES POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

La c.g.l. es un método muy apropiado para la determinación cuantitativa de los compuestos de azúcares (Blake y col., 1970). Se necesita una pequeña cantidad de muestra y existe una amplia gama de fases estacionarias capaces de resolver cualquier tipo de mezcla de azúcares. Presenta el inconveniente de tener que convertir estos en derivados volátiles. Esto se consigue mediante la transformación en trimetilsilil éteres, acetatos de alditoles, trifluoruroacetatos, acetatos de aldononitrilos, metilglucósidos etc. En este trabajo se utilizó los acetatos de alditoles por su facilidad de preparación.

La determinación cuantitativa de los azúcares que componen el polisacarido se realizó por c.g.l. de los correspondientes acetatos de alditoles, preparados según el método de Blakeney y col. (1983). Se utiliza inositol como patrón interno, que se añade después de realizada la hidrólisis del polisacárido. El patrón interno no coincide con ninguno de los azúcares presentes (Albersheim y col., 1967).

4.4.2.1. PREPARACION DE LOS ACETATOS DE ALDITOLES

Los monosacáridos de la despolimerización total del polisacárido se convirtieron en sus acetatos de alditoles según el procedimiento descrito por Blakeney y col. (1983).

Los monosacáridos se reducen con una solución de borohidruro sódico en dimetilsulfóxido al 2%. La reducción se realiza durante 90 min. a 40 °C por adición de la solución de borohidruro a la mezcla de monosacáridos y patrón interno en amoníaco 1 M. El exceso de borohidruro se elimina por adición de ácido acético concentrado. Se añade 1-metil-imidazol seguido de anhídrido acético. Después de 10 min. a temperatura ambiente se añaden 5 ml de agua destilada. Se extraen los acetatos de alditoles con diclorometano. Las fases orgánicas se lavan con agua destilada, se añade sulfato sódico anhidro y la disolución orgánica se seca bajo corriente de nitrógeno seco. Se disuelven en diclorometano.

4.4.2.2. INSTRUMENTACION Y CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

La separación de los acetatos de alditoles se realiza en un cromatografo Hewlett-Packard 5710 A con detector de ionización de llama, equipado de un registro integrador Varian CDS 401. Se utiliza una columna de vidrio (2 m x 0,6 cm) rellena de 3% SP-2340 en Supelcoport (100-120 mesh).

La temperatura de los distintos elementos del cromatografo son: temperatura del bloque de inyección,

250 °C; temperatura del detector, 250 °C; temperatura de la columna, 235 °C. El gas portador es nitrógeno a 20 ml/min.

5. TEST DE NODULACION

5.1. ESTERILIZACION DE LAS SEMILLAS

Para la esterilización de las semillas de *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Jamapa se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el polvo y suciedad adherido.
- 2) Se lavaron con etanol de 96% durante 3 min. agitando frecuentemente.
- 3) Se lavó con agua destilada estéril.
- 4) Se lavó con hipoclorito sódico al 20% en agua destilada estéril durante 5 min.
- 5) Se lavó con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a hipoclorito.
- 6) Se seleccionó las semillas que no habían sido dañadas durante el proceso.

5.2. GERMINACION DE LAS SEMILLAS

Una vez estériles las semillas, se colocaron en placas con agar-agua (9 g de agar Pronadisa en 1 l de agua destilada) a razón de 15 semillas/placa. Se mantuvieron a

28 °C durante 36-48 horas.

5.3. CRECIMIENTO DE LA PLANTA EN SOLUCION NUTRITIVA

Se colocaron las semillas germinadas en frascos de vidrios de 500 ml de capacidad, que previamente se habían llenado de vermiculita y a los que se añadieron 200 ml de solución nutritiva, esterilizandolos posteriormente en autoclave a 121 °C durante 20 min. En cada frasco se colocaron 2 semillas germinadas.

5.4. INOCULACION

Se realizó una suspensión del microorganismo en agua destilada estéril a partir de un cultivo de 24 horas en placa, y cada semilla se inoculó con 1 ml de la suspensión. Finalmente se cubrió con un poco de vermiculita estéril.

Los frascos se colocaron en la cámara de plantas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Periódicamente se añadió agua destilada estéril a los frascos. La presencia o ausencia de nódulos se analizó a las 2 semanas de inoculación.

5.5. ENSAYO DE EFECTIVIDAD

Para conocer la actividad nitrogenasa de las diferentes cepas de *R. leguminosarum* biovar. *phaseoli* CIAT899 estudiadas, se utilizó la técnica de reducción de acetileno a etileno, (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 incubaron 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.

6. REAISLAMIENTO DE RHIZOBIUM A PARTIR DE NODULOS

Los nódulos se esterilizaron superficialmente, sumergiéndolos en cloruro mercúrico al 0,1% en etanol al 10% durante 30 seg. Posteriormente se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. Los nódulos se colocaron en una placa de petri estéril a la que se adicionó unas gotas de agua destilada estéril y se aplastaron con una varilla de vidrio previamente flameada. El líquido resultante se tomó con un asa de platino y se sembró en medio TY adicionado de los antibióticos correspondientes. De las colonias crecidas se hicieron nuevos aislamientos para asegurar su pureza.

7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

El ADN purificado, total o digerido, fué corrido en geles horizontales de agarosa sumergidos en tampón TEA y preparados, por lo general al 1% en el mismo tampón (Maniatis y col., 1982).

El gel se tiñó durante 1 hora con bromuro de etidio (0,45 microgramos/ml en agua destilada), se destiñó durante 20 min en agua destilada y finalmente se visualizó en transiluminador de luz ultravioleta a 360 nm.

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon según la curva log Pm/movilidad, obtenida de acuerdo con las distancias de migración de los fragmentos *HindIII* del estándar lambda c1857.

8. RECUPERACION DEL ADN A PARTIR DE LOS GELES

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles por medio de la técnica de electroelución, seguida de purificación con fenol/cloroformo y precipitación con etanol del 96% (Maniatis y col., 1982).

9. EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN

9.1. ADN TOTAL

El ADN total de las cepas de *Rhizobium* se obtuvo por lisis con SDS/pronasa (Merck) seguida de sucesivas purificaciones con fenol, fenol/cloroformo, cloroformo y finalmente precipitado con etanol y lavado con etanol del 70% (Dhaese y col., 1979).

9.2. ADN PLASMIDICO

El ADN de plásmidos o cósmidos, tanto a gran escala como en minipreparaciones (a partir de 1 l o 1 ml de cultivo), se aisló por el método de lisis alcalina descrita en el manual de Maniatis y col. (1982).

En las preparaciones a gran escala, el ADN es adicionalmente purificado por centrifugación isopícnica a equilibrio en gradiente de cloruro de cesio-bromuro de etidio, cargandose por cada litro de muestra un gradiente de

34 ml que se ultracentrifuga en rotor vertical Sorvall TV 850 durante 24 horas, a 39.000 rpm y 18 °C.

Tras la centrifugación, el bromuro de etidio se extrajo con alcohol isoamílico y cloruro de cesio se eliminó por diálisis prolongada frente a tampón TEA.

Cuando fué necesario, el ADN se concentró por precipitación con etanol.

10. HIBRIDACIONES DE ADN

La hibridación del ADN se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Kondorosi y col. (1982).

1) Preparación de los filtros

Los geles de agarosa fueron desnaturalizados con NaOH y neutralizados con Tris-HCL pH 8,0, exactamente como se describe en el manual de Maniatis y col. (1972). El ADN de los geles se transfirió a los filtros de nitrocelulosa (Schleicher y Schull BA 85, de 45 mm de diámetro de poro) por capilaridad de acuerdo con la técnica de Southern (1975), utilizando 20x SSC como solución de transferencia (1x SSC = NaCl 0,15 M; citrato sódico 0,015 M, pH 7,0). Tras la transferencia, los filtros se lavaron con 2x SSC, secados y horneados a vacío durante 2 horas a 80 °C.

2) Marcaje de ADN

El ADN se marcó mediante incorporación al azar de

deoxiuridintrifosfato marcado con digoxigenina. El dUTP se une a la digoxigenina con el hapteno esteroide (Dig-dUTP) por medio de un espaciador. Tras la hibridación con el ADN objetivo, los híbridos fueron detectados mediante enzimoimmunoensayo usando un anticuerpo conjugado (antidigoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina) y con una reacción enzimática colorimétrica con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y sal azul de nitrotetrazoilo, mediante el kit de marcaje no radiactivo suministrado por Boehringer-Mannheim.

V RESULTADOS

1. AISLAMIENTO DE MUTANTES POR TRANSPOSICION CON Tn5

Para la obtención de mutantes por mutagénesis al azar se utilizó el transposón Tn5 con una región *mob* que permite la movilización del mismo.

La mutagénesis se realizó por la técnica descrita en el Apartado 1.1 de Métodos.

La frecuencia de transferencia del transposón fué de $1,3 \times 10^{-4}$.

Los transconjugantes obtenidos (seleccionados previamente en medio TY adicionado de rifampicina y kanamicina) se analizaron para las características fenotípicas que se citan en el apartado siguiente.

2. CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LOS MUTANTES ALTERADOS EN EL EPS

Se aislaron 2379 colonias transconjugantes de las que se seleccionaron inicialmente 150, atendiendo al fenotipo que presentaban.

El 45,33% de las colonias presentaban mayor mucosidad que la cepa silvestre.

El 27,33% tenían aspecto rugoso.

El 14% presentaba un brillo en medio LB calcofluor distinto al de la cepa CIAT899.

El 13,33% restante producía menos EPS que la cepa silvestre.

De todos los mutantes aislados y tras estudios preliminares realizados a cada uno de ellos seleccionamos finalmente 9 mutantes (RSP1MJ, RSP4MJ, RSP9MJ, RSP10MJ, RSP21MJ, RSP25MJ, RSP29MJ, RSP30MJ y RSP44MJ), todos ellos con brillo en calcofluor igual al de la cepa silvestre, a los que se les estudió morfología de la colonia, producción de EPS, composición del mismo y propiedades simbióticas.

2.1 MORFOLOGIA DE LA COLONIA

De cada mutante a estudiar se aislaron colonias en medio 79 de Allen, y se observó la morfología que presentaban.

Los mutantes RSP1MJ, RSP4MJ, RSP9MJ, RSP10MJ, RSP21MJ, RSP29MJ, RSP30MJ y RSP44MJ presentaban colonias más pequeñas que la cepa silvestre y con aspecto rugoso, y únicamente el mutante RSP25MJ presentaba colonias con el mismo aspecto al de la cepa silvestre aunque de menor tamaño.

2.2 PRODUCCION DEL EPS

Para determinar la producción del EPS de cada mutante se utilizó la técnica descrita en los Apartados 4.1 y 4.2 de Métodos.

En la Figura 5 se muestra la producción en gramos de EPS/litro de los mutantes así como de la cepa silvestre, en la que se puede observar que sólo la cepa RSP25MJ presenta una producción en EPS aproximadamente igual al 50% con

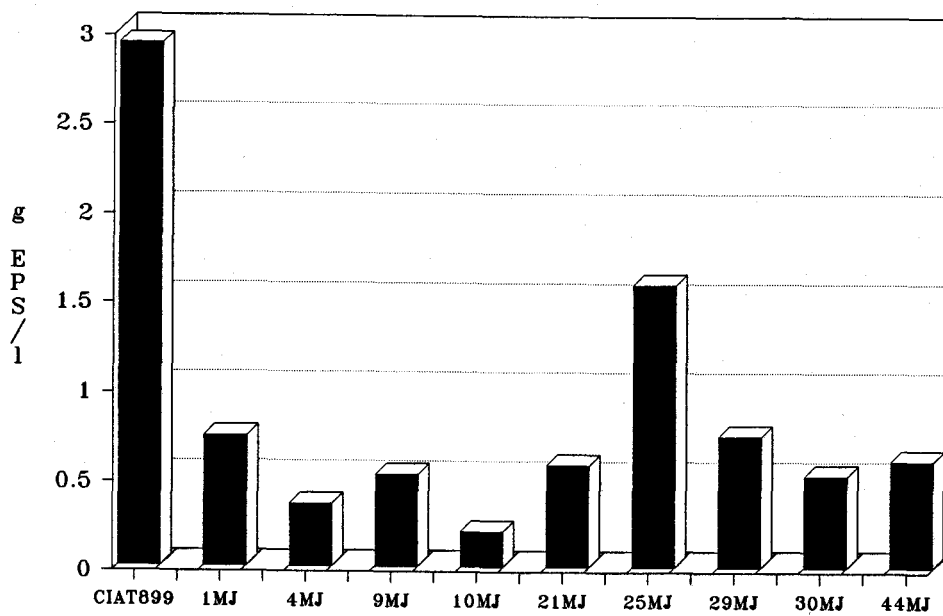


Figura 5.- Producción de EPS en g/l de la cepa CIAT899 y los distintos mutantes RSP (1MJ---44MJ).

respecto a la cepa silvestre. Las cepas RSP1MJ, RSP29MJ y RSP44MJ tienen una producción de EPS superior al 20% con respecto a la cepa CIAT899. El resto de los mutantes produce menos del 20% del EPS, siendo interesante señalar que el mutante RSP10MJ produce un 90% menos de EPS que la cepa silvestre.

2.3 ANALISIS DE LA COMPOSICION DEL EPS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

La composición cualitativa del EPS de cada mutante se realizó mediante estudios de C.L.A.R. (Apartado 4.4.1 de Métodos). En la Figura 6 se muestra el cromatograma correspondiente a una mezcla patrón que contiene ácido glucurónico, ácido galacturónico, glucosa, galactosa, piruvato, succinato y acetato. En las Figuras 7, 8 y 9 se muestran los cromatogramas obtenidos para los distintos mutantes estudiados.

Prácticamente, y por análisis cualitativo el ácido acético está representado en todos los mutantes menos en RSP10MJ (Figura 8-D), RSP25MJ (Figura 7-B) y RSP44MJ (Figura 9-D), apreciándose "a priori" que no existe variación en el contenido de azúcares, presentando glucosa y galactosa y no apareciendo ácidos urónicos. El ácido pirúvico no se detecta en estos cromatogramas por encontrarse enmascarado con la galactosa, aunque en algunos casos se resuelve parcialmente el mismo.

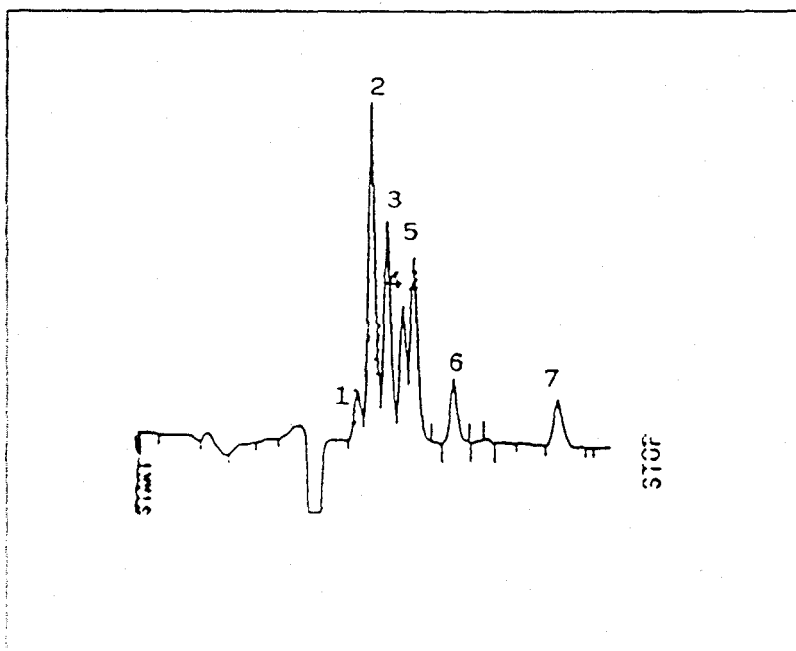
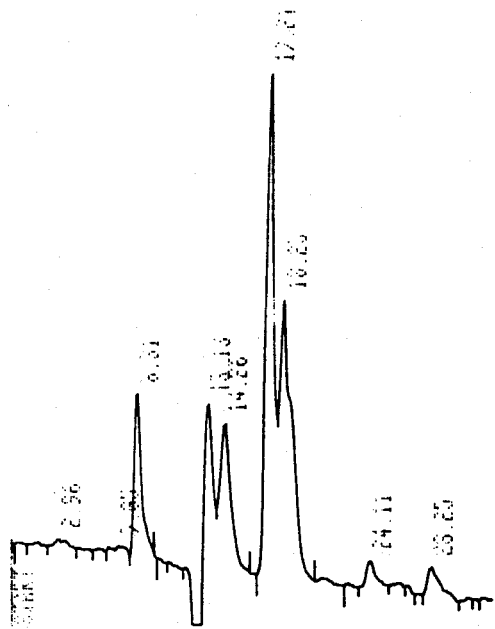


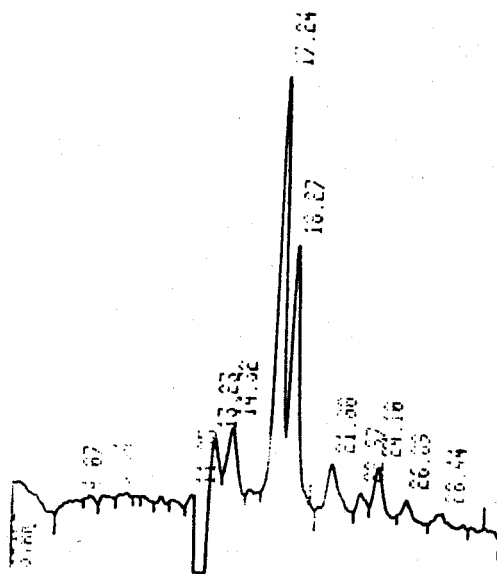
Figura 6.- Análisis cualitativo por C.L.A.R.
Cromatograma obtenido de una muestra patrón.

| PICOS | SUSTANCIAS DE REFERENCIA | Tr (min.) |
|-------|--------------------------|-----------|
| 1 | Acido glucurónico | 15,21 |
| 2 | Acido galacturónico | 16,67 |
| 3 | Glucosa | 17,00 |
| 4 | Galactosa | 18,01 |
| 5 | Acido pirúvico | 18,77 |
| 6 | Acido succínico | 21,44 |
| 7 | Acido acético | 28,45 |

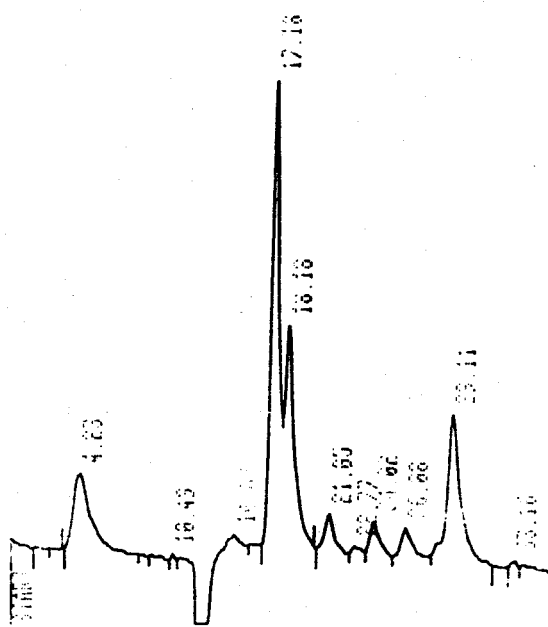
Figura 7.- Cromatogramas líquidos del EPS de las cepas CIAT899 (A), RSP25MJ (B), RSP29MJ (C) y RSP30MJ (D).



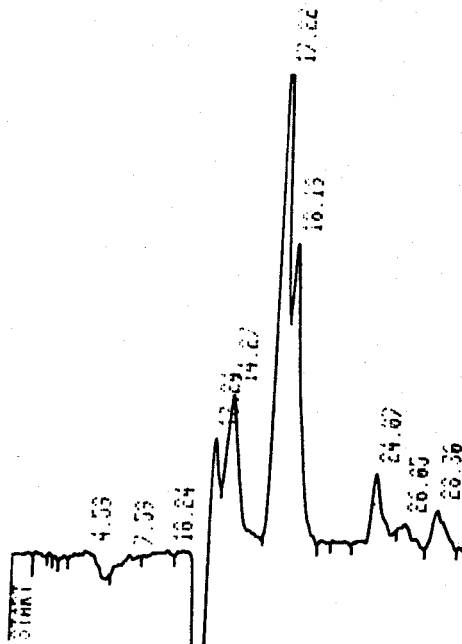
A



B

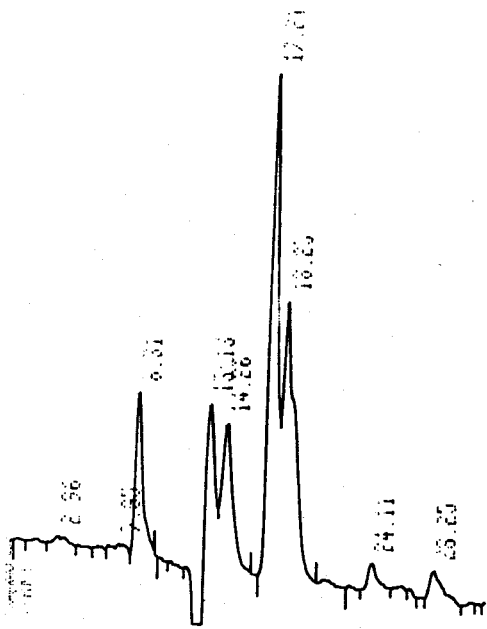


C

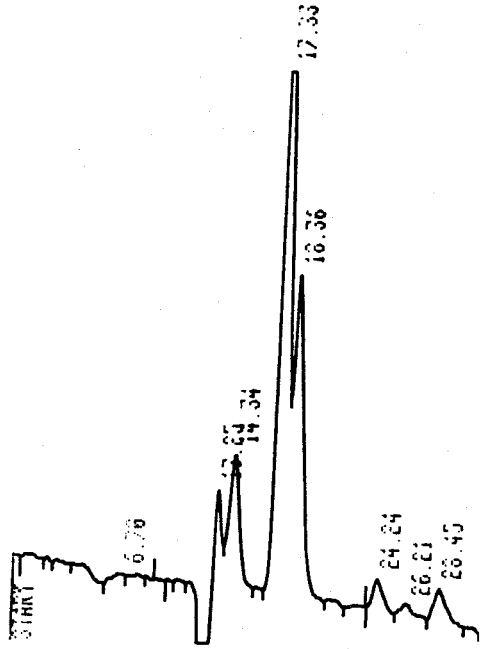


D

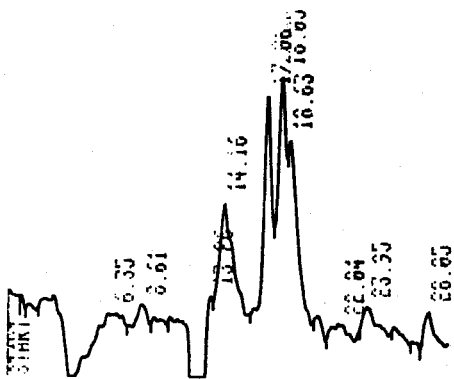
Figura 8.- Cromatogramas líquidos del EPS
de las cepas CIAT899 (A),
RSP4MJ (B), RSP9MJ (C) y
RSP10MJ (D).



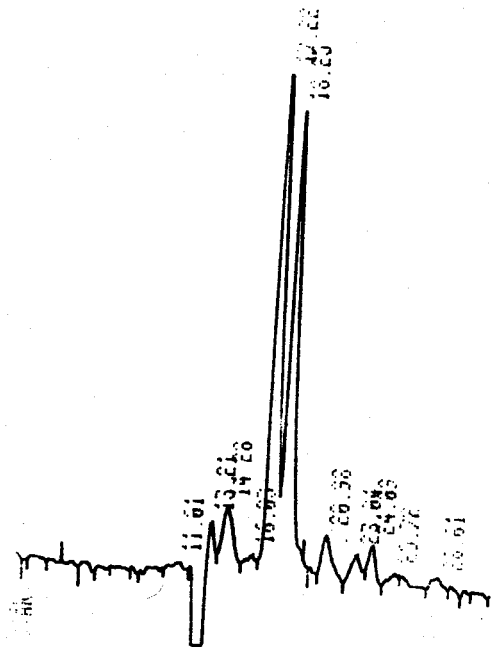
A



B

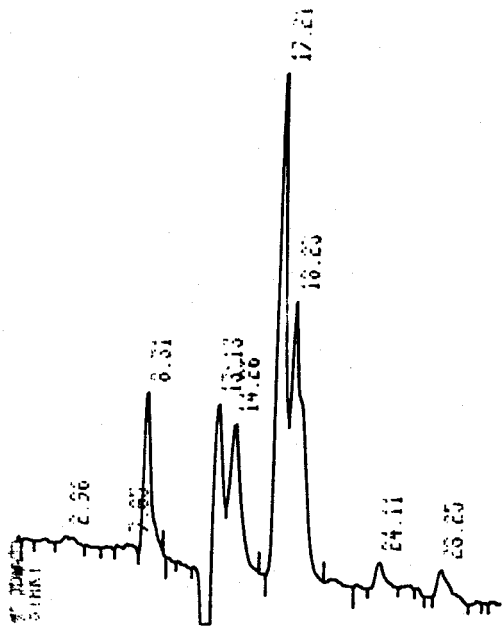


C

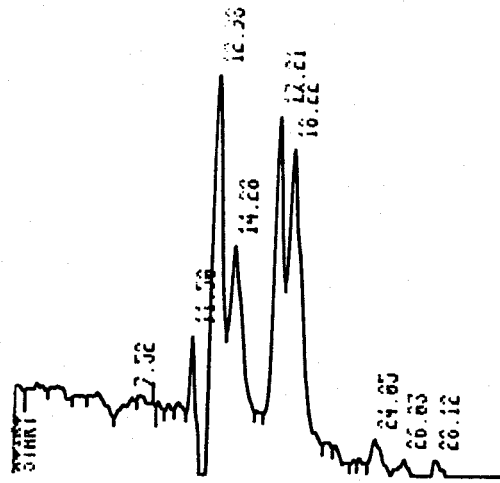


D

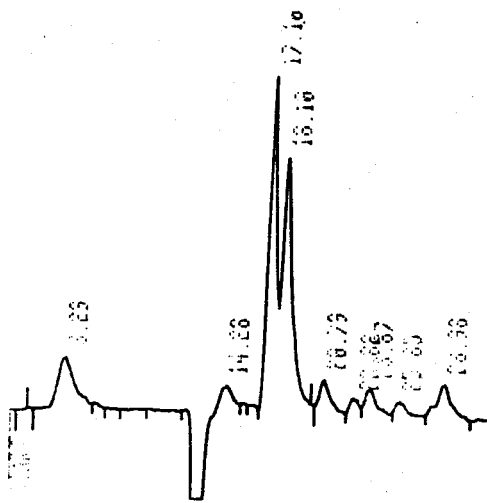
Figura 9.- Cromatogramas líquidos del EPS
de las cepas CIAT899 (A),
RSP1MJ (B), RSP21MJ (C) y
RSP44MJ (D).



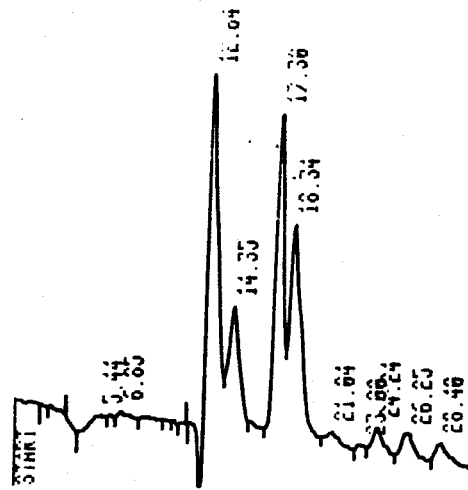
A



B



C



D

2.4. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS AZUCARES DEL EPS POR CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO

La determinación cuantitativa de azúcares se determinó por C.G.L. de los alditoles correspondientes (Apartado 4.4.2 de Métodos).

Como se observa en las Figuras 10, 11 y 12, donde se muestran los cromatogramas referidos, la relación molar glucosa:galactosa en todos los casos fué de 3:1, excepto para el mutante RSP4MJ (Figura 10-B) que fué de 2,5:1, y los mutantes RSP9MJ (Figura 10-C), RSP25MJ (Figura 11-C) y RSP30MJ (Figura 12-B) que fué de 2,7:1. La aparición de manosa se considera insignificante.

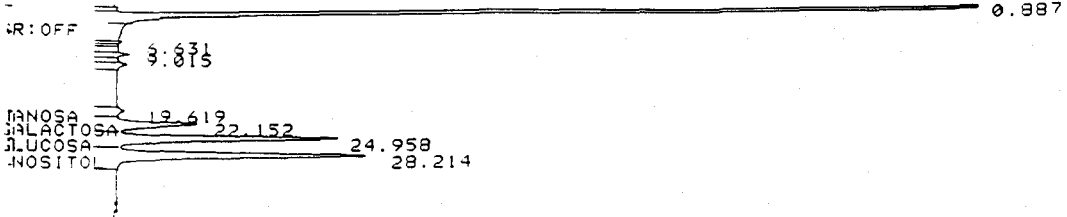
2.5. ENSAYO DE LA NODULACION

El análisis de la capacidad simbiótica de los mutantes se realizó mediante ensayo de la nodulación en planta tal y como se describe en el Apartado 5 de Métodos.

En la Tabla VIII aparecen reflejados los resultados de nodulación y fijación de nitrógeno en las distintas estirpes mutantes, así como en la cepa silvestre. Como se observa en dicha Tabla los mutantes RSP1MJ (Figura 37-B) y RSP29MJ (Figura 40-A) no formaron nódulos en planta, mientras que los mutantes RSP4MJ (Figura 38-A), RSP9MJ (Figura 38-B), RSP10MJ (Figura 38-C), RSP21MJ (Figura 39-A), RSP25MJ (Figura 37-C), RSP30MJ (Figura 41-A) y RSP44MJ (Figura 42-A) formaron

Figura 10.- Cuantificación de azúcares por cromatografía de gas-líquido del EPS de las cepas RSP1MJ (A), RSP4MJ (B) y RSP9MJ (C).

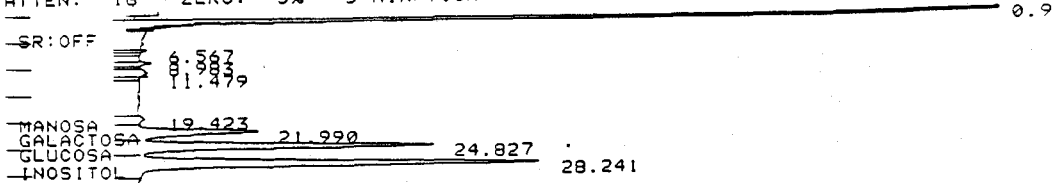
CHART SPEED 0.1 CM/MIN
ATTEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | GALACTOSA | 0.6554 | 22.152 | 89933 | 0.78 | VV |
| 2 | GLUCOSA | 1.8497 | 24.958 | 237416 | 0.88 | VV |
| 3 | INOSITOL | INT STD | 28.214 | 292704 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 2.5051 | | 420053 | | |

A

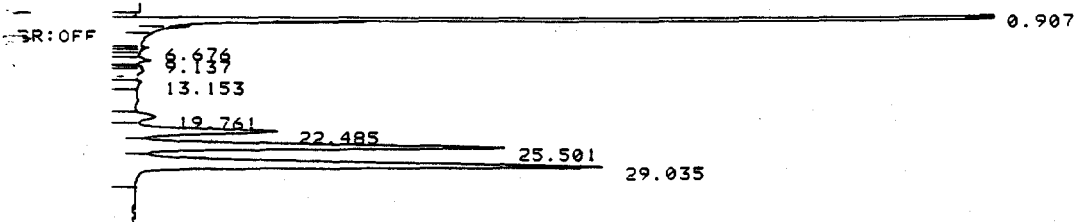
CHART SPEED 0.1 CM/MIN
ATTEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | GALACTOSA | 0.2982 | 21.990 | 137187 | 0.78 | VV |
| 2 | GLUCOSA | 0.7552 | 24.827 | 324978 | 0.88 | VV |
| 3 | INOSITOL | INT STD | 28.241 | 490685 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 1.0534 | | 952850 | | |

B

CHART SPEED 0.1 CM/MIN
ATTEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

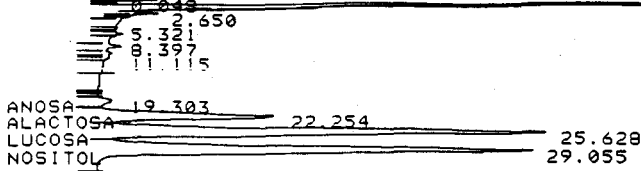


| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | | 0.0000 | 2.679 | 19048 | 0.09 | VB |
| 2 | MANOSA | 0.0449 | 19.761 | 25133 | 0.68 | BV |
| 3 | GALACTOSA | 0.2946 | 22.485 | 175364 | 0.77 | VV |
| 4 | GLUCOSA | 0.7964 | 25.501 | 443382 | 0.88 | VV |
| 5 | INOSITOL | INT STD | 29.035 | 634820 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 1.1359 | | 1297750 | | |

C

Figura 11.- Cuantificación de azúcares por cromatografía de gas-líquido del EPS de las cepas RSP10MJ (A), RSP21MJ (B) y RSP25MJ (C).

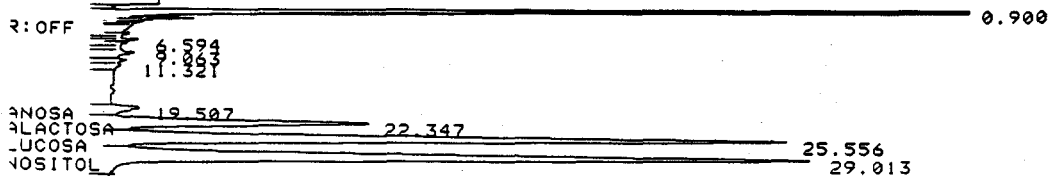
ART SPEED 0.1 CM/MIN
 TEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



A

| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 0 | | 0.0000 | 2.650 | 10077 | 0.09 | T |
| 1 | | 0.0000 | 8.930 | 12851 | 0.31 | VB |
| 3 | MANOSA | 0.0569 | 19.303 | 33522 | 0.66 | BV |
| 4 | GALACTOSA | 0.7901 | 22.254 | 494966 | 0.77 | VV |
| 5 | GLUCOSA | 2.2846 | 25.628 | 1338820 | 0.88 | VV |
| 6 | INOSITOL | INT STD | 29.055 | 1336410 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 3.1316 | | 3226650 | | |

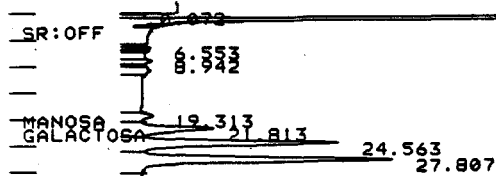
ART SPEED 0.1 CM/MIN
 TEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



B

| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | MANOSA | 0.0760 | 19.507 | 32900 | 0.67 | BV |
| 2 | GALACTOSA | 0.7002 | 22.347 | 322373 | 0.77 | VV |
| 3 | GLUCOSA | 2.0616 | 25.556 | 887918 | 0.88 | VV |
| 4 | INOSITOL | INT STD | 29.013 | 982154 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 2.8378 | | 2225350 | | |

CHART SPEED 0.1 CM/MIN
 ATTEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK

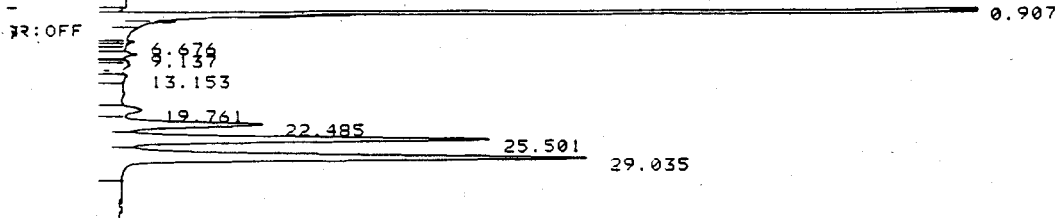


C

| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | GALACTOSA | 0.2908 | 21.813 | 79795 | 0.78 | VV |
| 2 | GLUCOSA | 0.8171 | 24.563 | 209780 | 0.88 | VV |
| 3 | INOSITOL | INT STD | 27.807 | 292722 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 1.1079 | | 582297 | | |

Figura 12.- Cuantificación de azúcares por cromatografía de gas-líquido del EPS de las cepas RSP29MJ (A), RSP30MJ (B) y RSP44MJ (C).

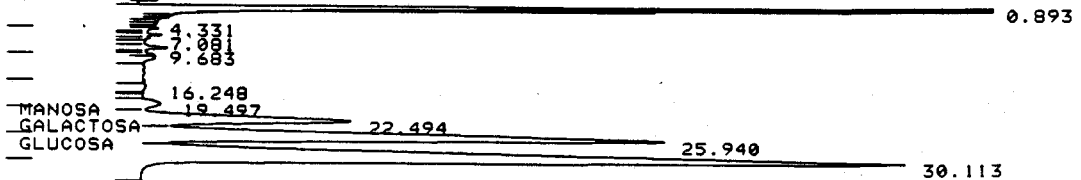
CHART SPEED 0.1 CM/MIN
ATTEN: 16 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



A

| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | | 0.0000 | 2.679 | 19048 | 0.09 | VB |
| 2 | MANOSA | 0.0449 | 19.761 | 25133 | 0.68 | BV |
| 3 | GALACTOSA | 0.2946 | 22.485 | 175364 | 0.77 | VV |
| 4 | GLUCOSA | 0.7964 | 25.501 | 443382 | 0.88 | VV |
| 5 | INOSITOL | INT STD | 29.035 | 634820 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 1.1359 | | 1297750 | | |

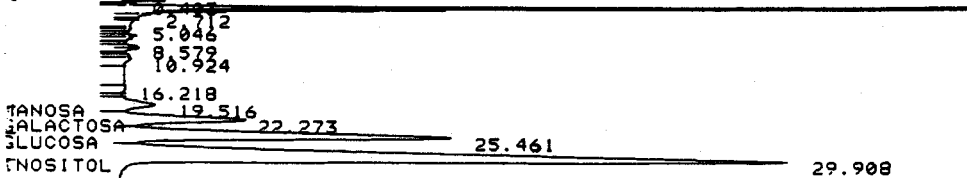
CHART SPEED 0.1 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



B

| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | | 0.0000 | 2.538 | 21418 | 0.08 | VV |
| 2 | | 0.0000 | 6.526 | 10003 | 0.22 | BV |
| 3 | | 0.0000 | 8.943 | 23337 | 0.30 | BV |
| 4 | | 0.0000 | 10.835 | 18565 | 0.36 | VB |
| 5 | MANOSA | 0.0202 | 19.497 | 52410 | 0.65 | BV |
| 6 | GALACTOSA | 0.2374 | 22.494 | 655942 | 0.75 | VV |
| 7 | GLUCOSA | 0.6857 | 25.940 | 1772640 | 0.86 | VV |
| 8 | INOSITOL | INT STD | 30.113 | 2947490 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 0.9433 | | 5501810 | | |

CHART SPEED 0.1 CM/MIN
ATTEN: 32 ZERO: 5% 5 MIN/TICK



C

| PEAK NO | PEAK NAME | RESULT | TIME (MIN) | AREA COUNTS | RRT | SEP CODE |
|---------|-----------|---------|------------|-------------|------|----------|
| 1 | | 0.0000 | 2.712 | 17589 | 0.09 | VV |
| 2 | | 0.0000 | 10.924 | 10226 | 0.37 | VB |
| 3 | MANOSA | 0.0417 | 19.516 | 92628 | 0.65 | BV |
| 4 | GALACTOSA | 0.1487 | 22.273 | 351321 | 0.74 | VV |
| 5 | GLUCOSA | 0.4594 | 25.461 | 1015420 | 0.85 | VV |
| 6 | INOSITOL | INT STD | 29.908 | 2520370 | 1.00 | VB |
| TOTALS: | | 0.6498 | | 4007550 | | |

TABLA VIII Características simbióticas de las cepas mutantes

| <u>ESTIRPE</u> | <u>TIPO DE NODULACION^a</u> | <u>FIJACION</u> | <u>ACTIVIDAD DE REDUCCION ACETILENO/ETILENO</u> |
|----------------------|---------------------------------------|------------------|---|
| CIAT899 ^b | Nod ⁺ | Fix ⁺ | 100 % |
| RSP1MJ | Nod ⁻ | Fix ⁻ | 0 |
| RSP4MJ | Nod ^{+/-} | Fix ⁻ | 1,66 % |
| RSP9MJ | Nod ^{+/-} | Fix ⁻ | 3,46 % |
| RSP10MJ | Nod ^{+/-} | Fix ⁻ | 0,74 % |
| RSP21MJ | Nod ^{+/-} | Fix ⁻ | 1,93 % |
| RSP25MJ | Nod ^{+/-} | Fix ⁻ | 1,76 % |
| RSP29MJ | Nod ⁻ | Fix ⁻ | 0 |
| RSP30MJ | Nod ^{+/-} | Fix ⁻ | 3,17 % |
| RSP44MJ | Nod ^{+/-} | Fix ⁻ | 1,07 % |

^a Nod⁺: Presencia de nódulos en la planta.

Nod⁻: Ausencia de nódulos en la planta.

Nod^{+/-}: Nódulos pequeños y blancos.

^b El número de nódulos por planta es de 75-80.

nódulos pequeños y blancos en las raíces.

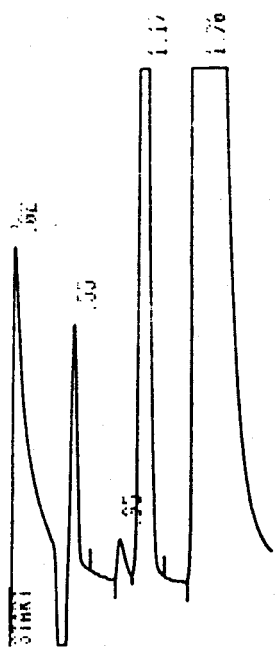
Cuando se les midió la capacidad de fijación de nitrógeno por cromatografía de gases (Apartado 5.5 de Métodos) se vió que esta capacidad era nula para los mutantes RSP10MJ y RSP44MJ (Figuras 13-B y 13-C). El resto de los mutantes que presentaban nódulos pequeños y blancos tenían disminuida la capacidad para reducir el nitrógeno a acetileno (Figura 14), comparada con la de la cepa silvestre (Figura 13 -A).

3. ESTUDIO DEL NUMERO DE COPIAS DE Tn5 EN LOS TRANSCONJUGANTES OBTENIDOS

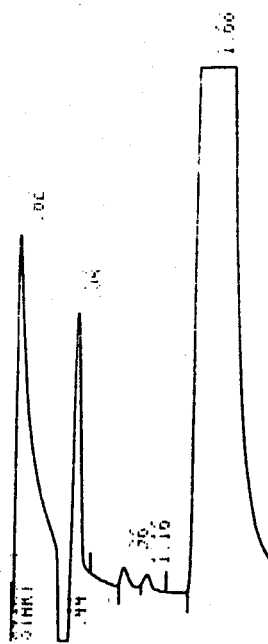
Para poder confirmar que los mutantes obtenidos son puntuales y que la alteración fenotípica es debida a la presencia de una sola inserción en el material genético, se realizó el análisis molecular de los mutantes por hibridación con una sonda Tn5.

En la Figura 15 se muestra el análisis de los mutantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899 mediante hibridación. Se utilizó como sonda Tn5 (pSUP5011) marcado con digoxigenina-dUTP (Boehringer-Mannheim), frente a ADN total de los distintos mutantes digerido con *EcoRI*. Como se observa, aparece una única banda en los mutantes analizados, los que indica la presencia de una sólo inserción.

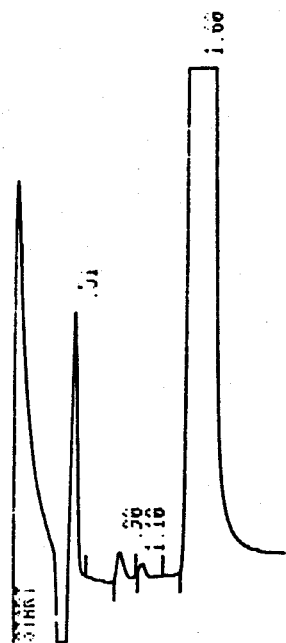
Figura 13.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno ($tr \approx 1,7$) a etileno ($tr \approx 1,1$) por las cepas CIAT899 (A), RSP10MJ (B) y RSP44MJ (C).



A

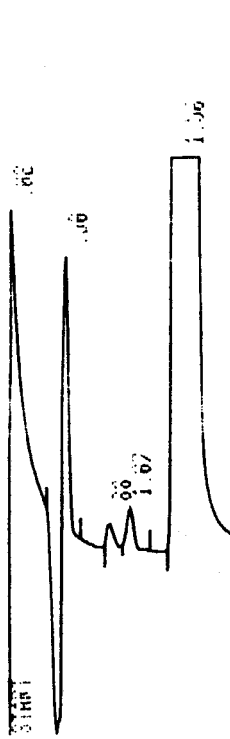


B

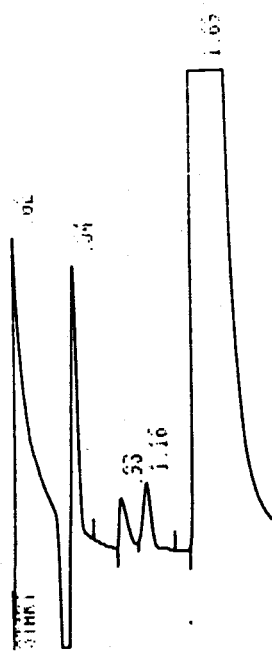


C

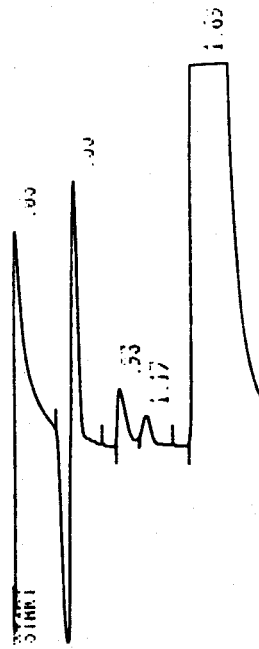
Figura 14.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno a etileno por las cepas RSP4MJ (A), RSP9MJ (B), RSP21MJ (C), RSP25MJ (D) y RSP30MJ (E).



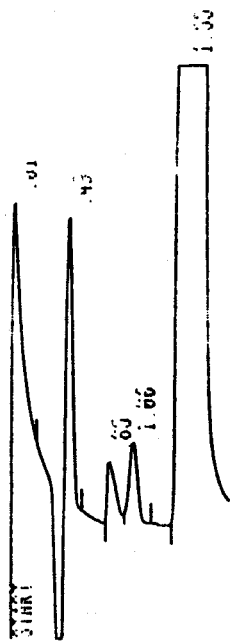
A



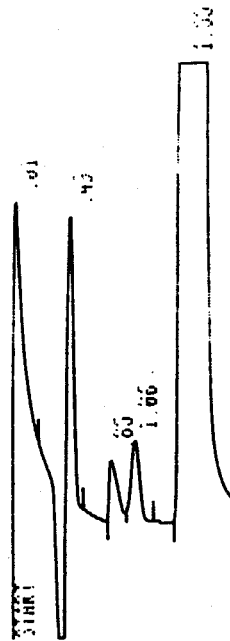
B



C



D



E

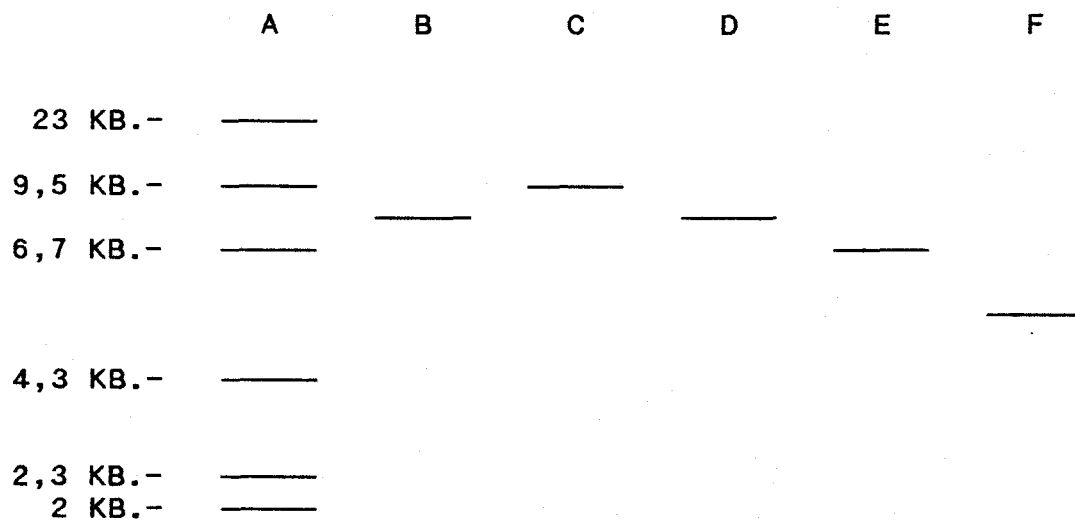


Figura 15.- Esquema de algunos de las hibridaciones realizadas frente a la sonda Tn5::*mob*.

Carril A: Representa ADN de Lambda cortado con *HindIII*.

En el resto de los carriles B - F se representa el ADN total de algunos de los mutantes cortando con *EcoRI*. B: RSP9MJ; C: RSP10MJ; D: RSP21MJ; E: RSP25MJ y F: RSP44MJ.

4. COMPLEMENTACION DE MUTANTES CON COSMIDOS PORTADORES DE GENES EXO DE *R. MELILOTI*

La complementación se realizó mediante la técnica de conjugación en placa descrita en el Apartado 1.2 de Métodos.

La selección de transconjugantes se llevó a cabo sobre medio TY adicionado de rifampicina, kanamicina y tetraciclina.

La frecuencia de transferencia de los cósmidos de *R. meliloti* osciló entre 10^{-1} y 10^{-2} .

4.1. ANALISIS DE LA MORFOLOGIA DE LA COLONIA DE LOS TRANSCONJUGANTES OBTENIDOS

De cada conjugación se aislaron 100 colonias en medio 79 de Allen adicionado de los antibióticos correspondientes, y se estudió la mucosidad y la morfología de dichas colonias comparandolas con la cepa silvestre y el mutante de procedencia.

Como se observa en la Tabla IX, las características fenotípicas de las colonias y el porcentaje de complementación variaba de un transconjugante a otro.

El mutante RSP1MJ no complementaba con el cósmido pD2 de *R. meliloti*. Si bien sí parecía complementar con los cósmidos pD5, pD15 y pD34, el porcentaje de dicha complementación era en los tres casos bastante bajo.

El transconjugante RSP1MJ-5P presentaba una mucosidad y

TABLA IX Características fenotípicas y porcentaje de complementación de los transconjugantes.

| <u>C E P A</u> | <u>CARACTERISTICAS FENOTIPICAS</u> | <u>COMPLEMENTACION (%)</u> |
|----------------|---|----------------------------|
| RSP1MJ-2P | Colonias del mismo aspecto que el mutante. | 0,00 |
| RSP1MJ-5P | Morfología y mucosidad similar a RSP1MJ. Un 4% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 4,00 |
| RSP1MJ-15P | Igual morfología que el mutante. Un 6% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 4,00 |
| RPS1MJ-34P | Mayor mucosidad que el mutante. Un 4% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 2,00 |
| RSP4MJ-2P | Mayor mucosidad que el mutante. Un 10% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 8,00 |
| RSP4MJ-5P | Mayor mucosidad que el mutante. Un 18% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 16,00 |
| RSP4MJ-5P | Mayor mucosidad que el mutante. Un 4% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 4,00 |
| RSP4MJ-34P | Morfología muy similar a la cepa silvestre. Un 12% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 12,00 |
| RSP9MJ-2P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 12% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 12,00 |
| RSP9MJ-5P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 12% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 6,00 |

.../...

| C E P A | CARACTERISTICAS FENOTIPICAS | COMPLEMENTACION (%) |
|-------------|--|---------------------|
| RSP9MJ-15P | Igual morfología que el mutante. Un 4% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 4,00 |
| RSP9MJ-34P | Morfología igual al mutante. Un 16% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 12,00 |
| RSP10MJ-2P | Morfología igual al mutante. Un 21,73% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 8,69 |
| RPS10MJ-5P | Mayor mucosidad que el mutante. Un 16% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 8,00 |
| RSP10MJ-15P | Mayor mucosidad que el mutante. Un 10% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 10,00 |
| RSP10MJ-34P | Mayor mucosidad que el mutante. Un 10% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 4,00 |
| RSP21MJ-2P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 42,8% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 42,80 |
| RSP21MJ-5P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 56,25% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 37,50 |
| RSP21MJ-15P | Todas la colonias presentan la misma morfología que el mutante. | 0,00 |
| RSP21MJ-34P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 43,48% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 37,78 |
| RSP25MJ-2P | Igual morfología que el mutante. | 0,00 |
| RSP25MJ-5P | Igual morfología que el mutante. | 0,00 |

.../...

| <u>C E P A</u> | <u>CARACTERISTICAS FENOTIPICAS</u> | <u>COMPLEMENTACION (%)</u> |
|----------------|--|----------------------------|
| RSP25MJ-15P | Igual morfología que el mutante. | 0,00 |
| RSP25MJ-34P | Igual morfología que el mutante. | 0,00 |
| RSP29MJ-2P | Morfología similar al mutante. Un 6,25% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 2,08 |
| RSP29MJ-5P | Morfología similar al mutante. Un 8,33% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 6,25 |
| RSP29MJ-15P | Morfología similar al mutante. Un 10,42% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 6,25 |
| RSP29MJ-34P | Morfología similar al mutante. Un 20,83% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 6,25 |
| RSP30MJ-2P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 18,75% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 10,41 |
| RSP30MJ-5P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 30% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 30,00 |
| RSP30MJ-15P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 30,76% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 23,07 |
| RSP30MJ-34P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 33,33% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 10,42 |
| RSP44MJ-2P | Morfología similar a la cepa silvestre. Un 28% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 12,00 |
| RSP44MJ-5P | Morfología similar al mutante. Un 4% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 2,00 |
| RSP44MJ-15P | Todas las colonias presentan la misma morfología que el mutante. | 0,00 |

.../...

| <u>C E P A</u> | <u>CARACTERISTICAS FENOTIPICAS</u> | <u>COMPLEMENTACION (%)</u> |
|----------------|---|----------------------------|
| RSP44MJ-34P | Morfología similar al mutante. Un 6% recupera el tamaño de la cepa silvestre. | 6,00 |

morfología semejante al mutante. RSP1MJ-15P y RSP1MJ-34P presentaban mayor mucosidad que RSP1MJ aunque el tamaño de la colonia era en la mayoría de los casos igual al mutante.

El mutante RSP4MJ complementaba con los cuatro cósmidos, presentando un mayor número de colonias que restauraban el fenotipo de la cepa silvestre en los transconjugantes RSP4MJ-5P y RSP4MJ-34P.

El mutante RSP9MJ también complementaba con todos los cósmidos usados en este estudio, presentando mayor número de colonias complementadas RSP9MJ-2P y RSP9MJ-34P.

El mutante RSP10MJ presentaba una complementación con los cuatro cósmidos que osciló entre el 4 y el 10%. Las colonias de estos cuatro transconjugantes fueron variables en tamaño y entre el 10 y el 20% de las mismas presentaron mayor tamaño que el mutante aunque no restaurasen totalmente el fenotipo silvestre.

La estirpe RSP21MJ no complementó con el cósmido pD15, presentando todas las colonias igual fenotipo que el mutante. Los tres transcojugantes restantes presentaron un alto porcentaje de complementación.

El mutante RSP25MJ no complementó con ningún cósmido de *R. meliloti*.

Las estirpes RSP29MJ-2P, RSP29MJ-5P, RSP29MJ-15P y RSP29MJ-34P presentaron colonias iguales a las de la cepa silvestre, si bien en muy bajo número, aunque el número de colonias que presentaban mayor mucosidad que el mutante era algo más elevado.

RSP30MJ complementó con los cuatro cósmidos aunque lo hacía en mayor proporción con el pD5.

RSP44MJ no complementó la morfología de la colonia de la cepa CIAT899 con el cósmido pD15. El número de colonias complementadas en RSP44MJ-5P y RSP44MJ-34P fué inferior al 10% y sólo RSP44MJ-2P complementó en morfología en más de 10 colonias.

En la Figura 16 ofrecemos algunos de los ejemplos más destacados.

4.1.1. PRODUCCION DEL EPS DE LOS MUTANTES COMPLEMENTADOS

Se eligieron algunas de las colonias de los transconjugantes que complementaron la producción de EPS en placa y se les determinó la producción del mismo, comparandola con la cepa silvestre y el mutante del que procedían.

En las Figuras 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 se comparan los gramos de EPS/litro de la cepa silvestre y de cada mutante con sus complementados. En ningún caso se obtuvo una restauración total del fenotipo silvestre.

En la Figura 17 se puede observar que sólo RSP1MJ-15P aumenta la producción de EPS con respecto al mutante y sólo en algo más del 5%. RSP1MJ-5P y RSP1MJ-34P producen menos EPS que el mutante.

De los complementados de RSP4MJ (Figura 18) RSP4MJ-2P y RSP4MJ-5P producen la misma cantidad de EPS que el mutante,

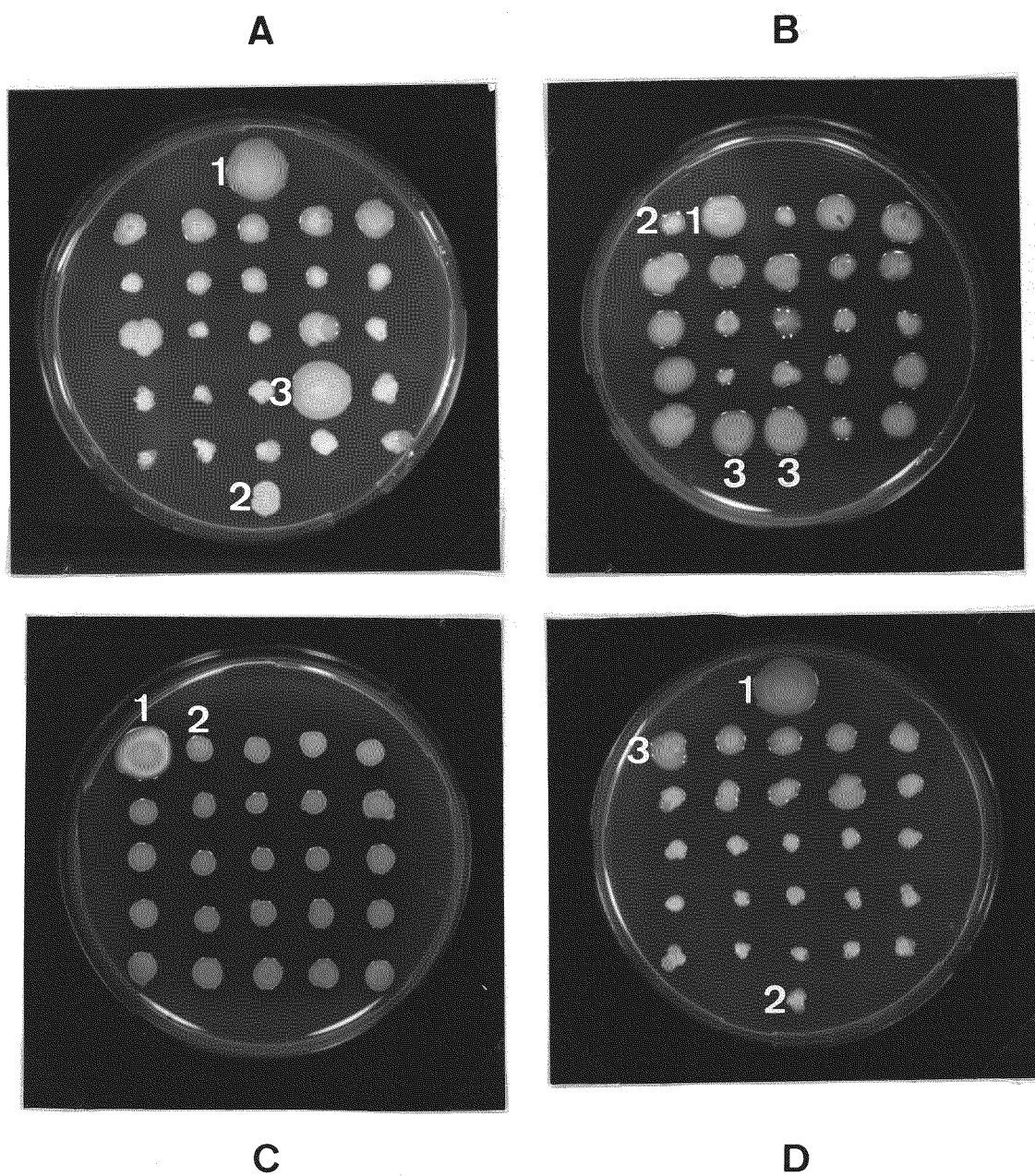


Figura 16.- Análisis de la morfología de la colonia de los transconjugantes RSP1MJ-5P (A), RSP9MJ-2P (B), RSP25MJ-34P (C) y RSP44MJ-34P (D). La colonia correspondiente a la cepa silvestre se señala en la figura con el número 1, los números 2 y 3 señalan las referidas al mutante y al transconjugante complementado respectivamente.

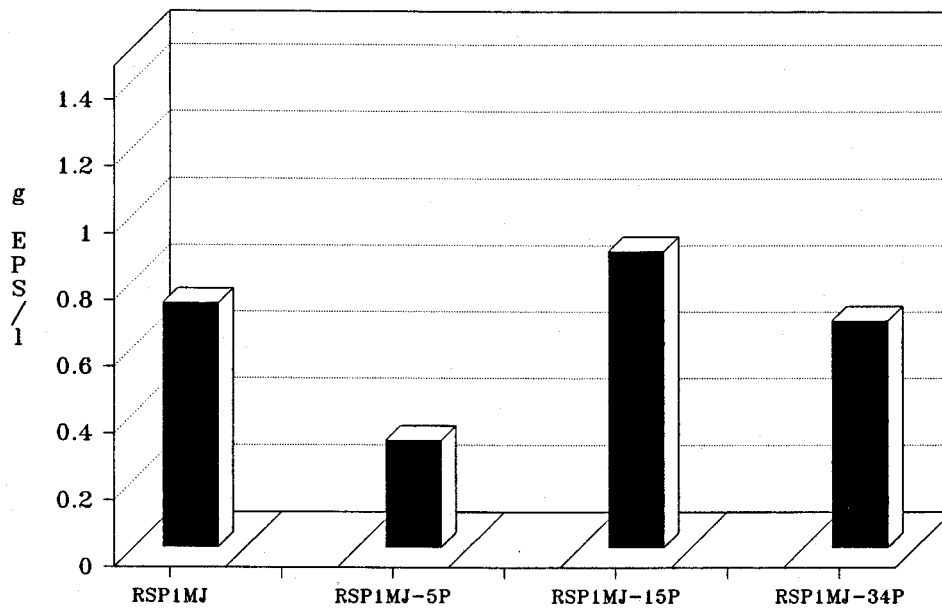


Figura 17.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP1MJ y de los transconjugantes RSP1MJ-5P, RSP1MJ-15P y RSP1MJ-34P.

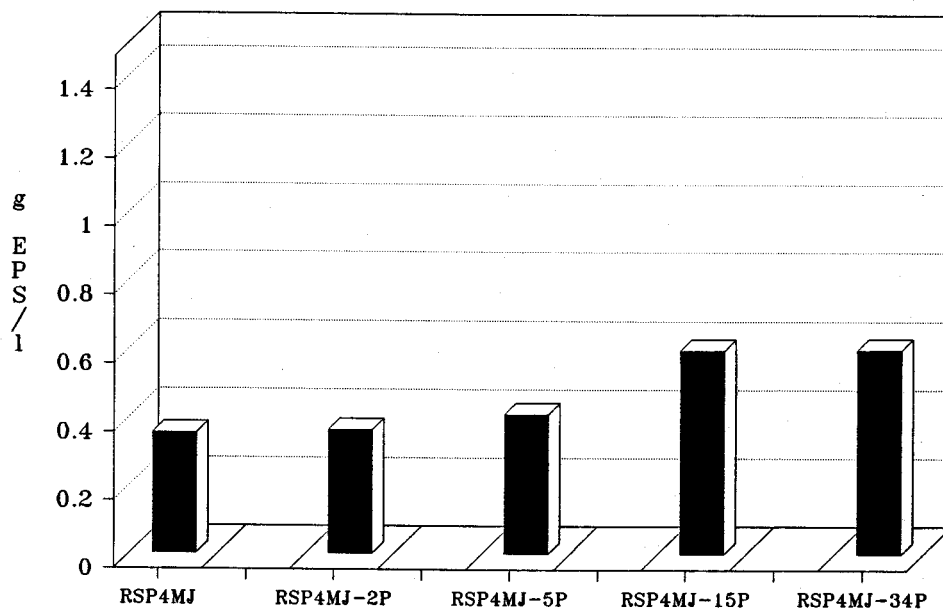


Figura 18.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP4MJ y de los transconjugantes RSP4MJ-2P, RSP4MJ-5P, RSP4MJ-15P y RSP4MJ-34P.

RSP4MJ-15P produce aproximadamente un 5% menos de EPS. Sólo RSP4MJ-34P aumenta la producción de EPS hasta un 20% con respecto a la cepa silvestre.

En la Figura 19 se pone de manifiesto que ninguno de los transconjugantes complementados produce mayor cantidad de EPS que el mutante RSP9MJ, sino que por el contrario la producción se ve disminuida.

La Figura 20 refleja que RSP10MJ-2P y RSP10MJ-34P aumentan la producción de EPS con respecto al mutante, llegando incluso en el caso de RSP10MJ-34P a incrementarse la producción en más del 50% con respecto a RSP10MJ. La producción en RSP10MJ-5P y RSP10MJ-15P permanece prácticamente invariable comparada con la del mutante.

RSP21MJ-2P y RSP21MJ-5P (Figura 21) producen más cantidad de EPS que el mutante de procedencia, al igual que RSP29MJ-15 y sobre todo RSP29MJ-34P (Figura 22), llegando este último a doblar la producción de EPS con respecto al mutante.

Excepto con el cósmido pD34, la producción de EPS en RSP30MJ se ve aumentada en presencia de los cósmidos de *R. meliloti* (Figura 23), ocurriendo lo contrario para el mutante RSP44MJ, que disminuye la producción de EPS en presencia de los tres cósmidos (Figura 24).

4.1.2. ENSAYO DE NODULACION DE LOS MUTANTES COMPLEMENTADOS

Se realizó un ensayo de nodulación con aquellos

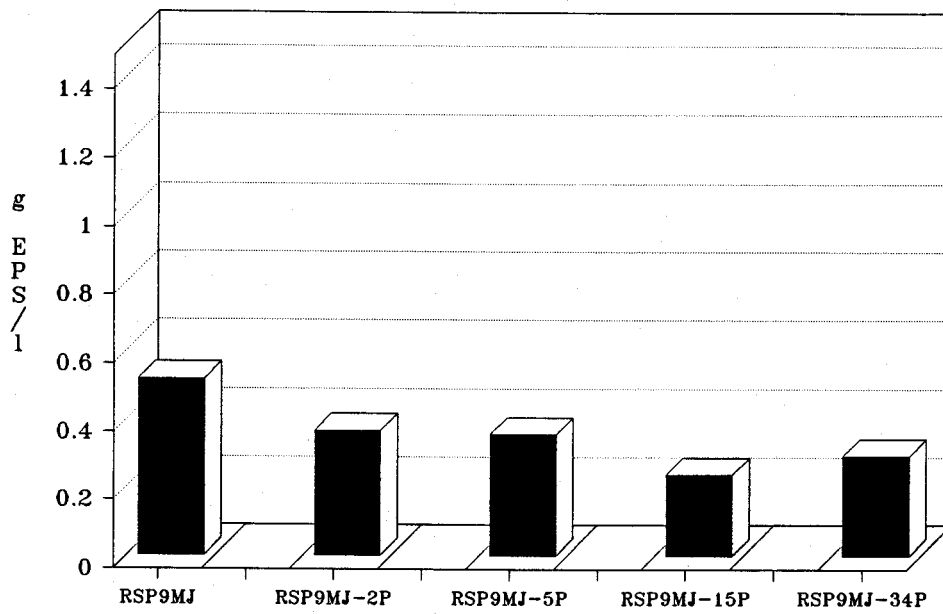


Figura 19.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP9MJ y de los transconjugantes RSP9MJ-2P, RSP9MJ-5P, RSP9MJ-15P y RSP9MJ-34P.

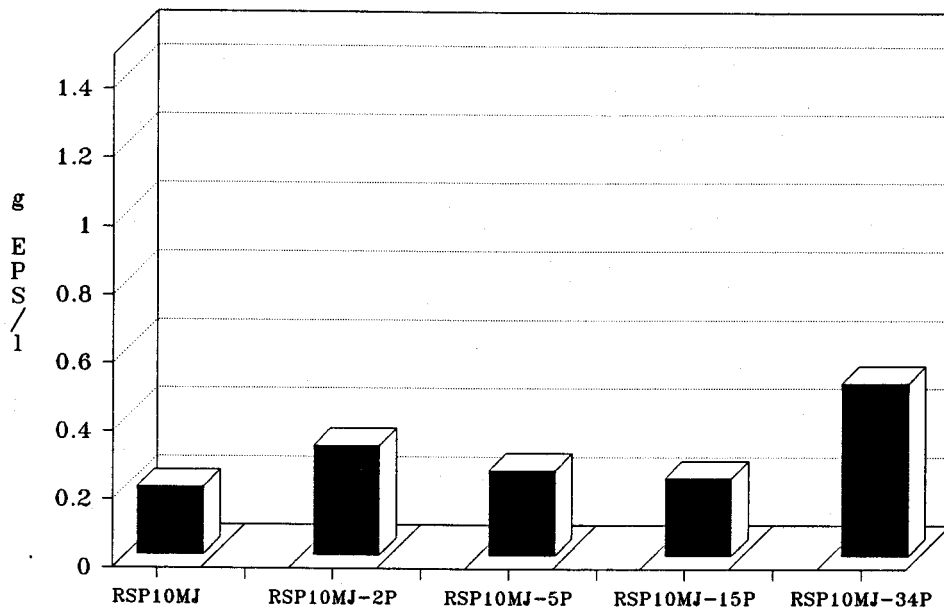


Figura 20.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP10MJ y de los transconjugantes RSP10MJ-2P, RSP10MJ-5P, RSP10MJ-15P y RSP10MJ-34P.

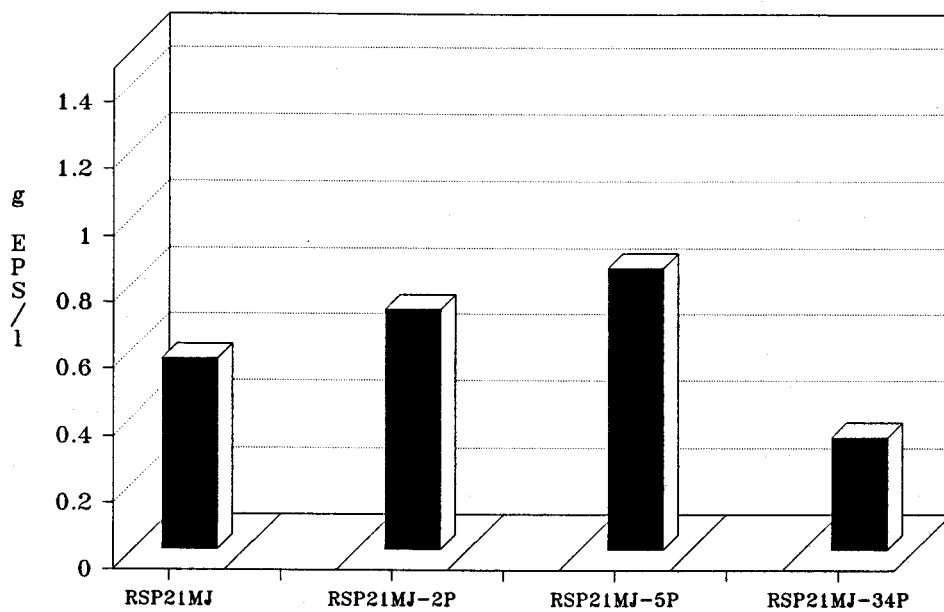


Figura 21.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP21MJ y de los transconjugantes RSP21MJ-2P, RSP21MJ-5P y RSP21MJ-34P.

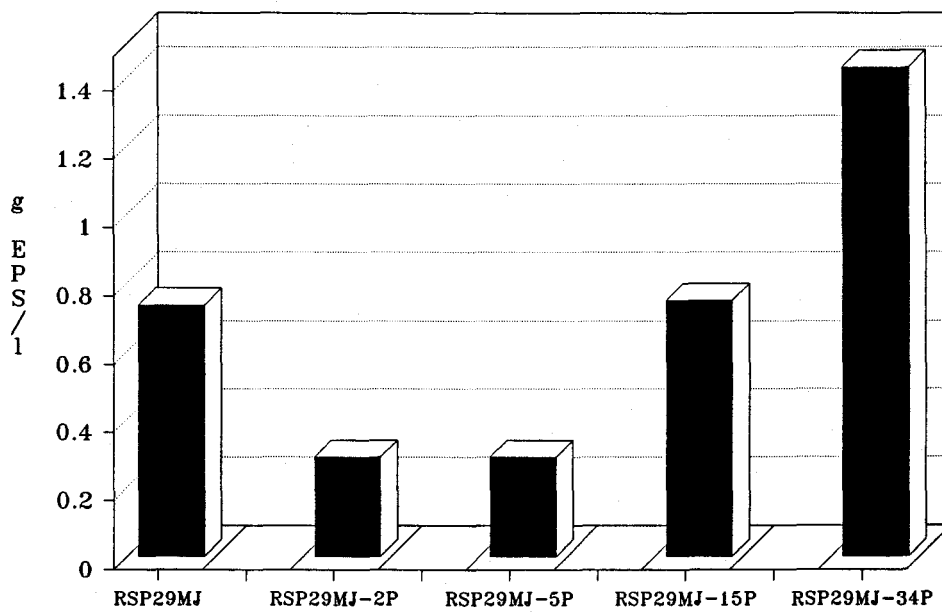


Figura 22.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP29MJ y de los transconjugantes RSP29MJ-2P, RSP29MJ-5P, RSP29MJ-15P y RSP29MJ-34P.

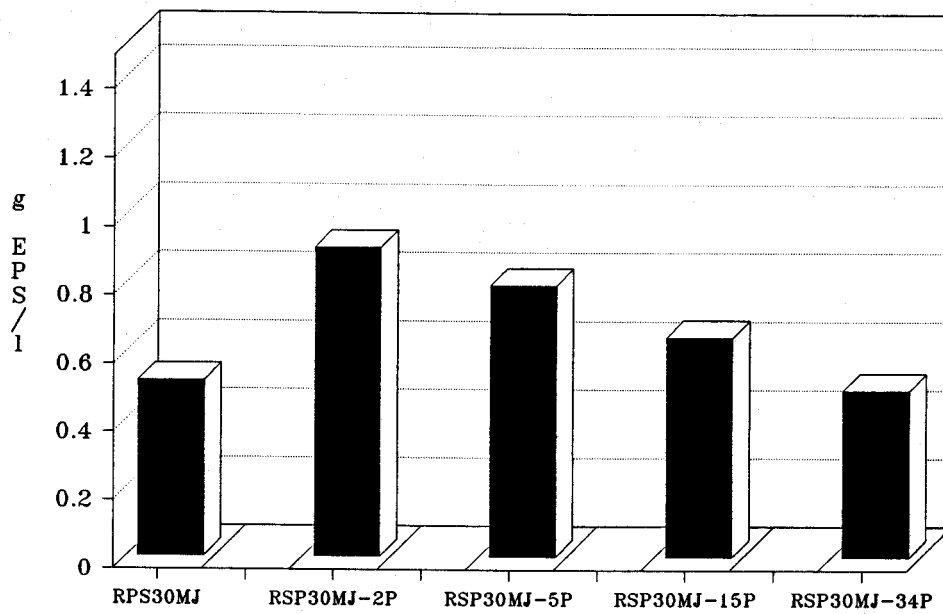


Figura 23.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP30MJ y de los transconjugantes RSP30MJ-2P, RSP30MJ-5P, RSP30MJ-15P y RSP30MJ-34P.

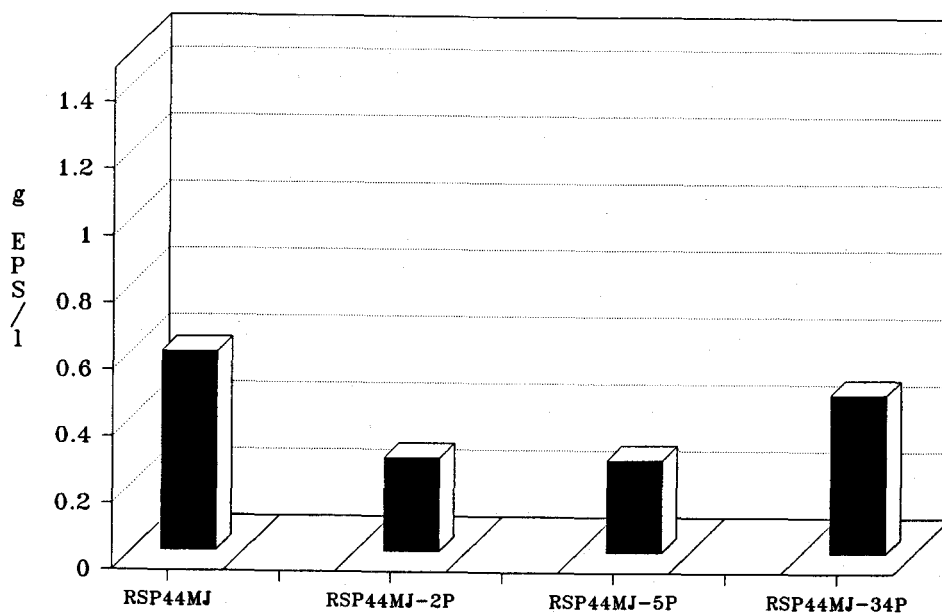


Figura 24.- Producción de EPS en g/l de la cepa RSP44MJ y de los transconjugantes RSP44MJ-2P, RSP44MJ-5P y RSP44MJ-34P.

transconjugantes que complementaban en mucosidad con respecto a la cepa silvestre.

Se usó como control positivo la cepa CIAT899 y los distintos mutantes.

En la Tabla X se pone de manifiesto los resultados obtenidos.

Ninguno de los transconjugantes complementados de la cepa RSP1MJ produjo nodulación en planta.

Los mutantes RSP4MJ, RSP30MJ y RSP44MJ no variaron sus propiedades simbióticas con los cósmidos de *R. meliloti*.

RSP9MJ producía 58 nódulos por planta cuando se le introdujo la región *exoD* de *R. meliloti* (Figura 38-E), si bien estos nódulos no fijaban nitrógeno (Figura 25-B). La presencia de los restantes cósmidos en el genoma del mutante no modificó sus características simbióticas.

RSP10MJ sólo noduló en planta con el cósmido pD34 (Figura 38-F). Los nódulos aparecidos producían la reducción de nitrógeno a acetileno (Figura 25-D).

Los transconjugantes de RSP21MJ formaron nódulos, si bien sólo hubo fijación de nitrógeno en RSP21MJ-2P y RSP21MJ-5P (Figuras 26, y 39).

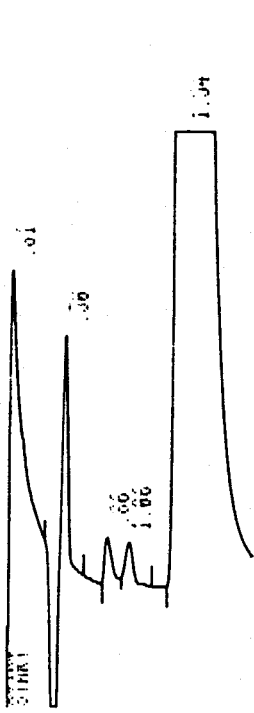
RSP29MJ-2P presentó las mismas características simbióticas que el mutante. RSP29MJ-5P dió lugar a la formación de nódulos no fijadores (Figuras 27-B y 40-B). RSP29MJ-15P (Figuras 27-C y 40-C) y RSP29MJ-34P (Figuras 27-D y 40-D) formaron nódulos en la raíz de la planta capaces de reducir el nitrógeno.

TABLA X Ensayo de nodulación de los transconjugantes complementados.

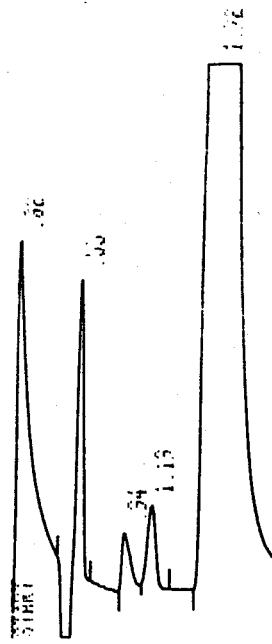
| C E P A | NODULACION | Nº DE NODULOS | FIJACION | % FIJACION |
|-------------|--------------------|---------------|------------------|------------|
| RSP1MJ-5P | Nod ⁻ | ———— | ———— | |
| RSP1MJ-15P | Nod ⁻ | ———— | ———— | |
| RSP1MJ-34P | Nod ⁻ | ———— | ———— | |
| RSP4MJ-2P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP4MJ-5P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP4MJ-15P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP4MJ-34P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP9MJ-2P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP9MJ-5P | Nod ⁺ | 58 nod/planta | Fix ⁻ | 4,60 |
| RSP9MJ-15P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP9MJ-34P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP10MJ-2P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP10MJ-5P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP10MJ-15P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP10MJ-34P | Nod ⁺ | 74 nod/planta | Fix ⁺ | 54,31 |
| RSP21MJ-2P | Nod ⁺ | 68 nod/planta | Fix ⁺ | 46,92 |
| RSP21MJ-5P | Nod ⁺ | 66 nod/planta | Fix ⁺ | 10,71 |
| RSP21MJ-34P | Nod ⁺ | 61 nod/planta | Fix ⁻ | 3,23 |
| RSP29MJ-2P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| RSP29MJ-5P | Nod ⁺ | 33 nod/planta | Fix ⁻ | 2,87 |
| RSP29MJ-15P | Nod ⁺ | 34 nod/planta | Fix ⁺ | 13,00 |
| RSP29MJ-34P | Nod ⁺ | 60 nod/planta | Fix ⁺ | 26,62 |
| RSP30MJ-2P | Nod ^{+/-} | ———— | Fix ⁻ | |
| | | | .../... | |

| <u>C E P A</u> | <u>NODULACION</u> | <u>Nº DE NODULOS</u> | <u>FIJACION</u> | <u>% FIJACION</u> |
|----------------|-------------------|----------------------|-----------------|-------------------|
| RSP30MJ-5P | Nod+/- | _____ | Fix- | |
| RSP30MJ-15P | Nod+/- | _____ | Fix- | |
| RSP30MJ-34P | Nod+/- | _____ | Fix- | |
| RSP44MJ-2P | Nod+/- | _____ | Fix- | |
| RSP44MJ-5P | Nod+/- | _____ | Fix- | |
| RSP44MJ-34P | Nod+/- | _____ | Fix- | |

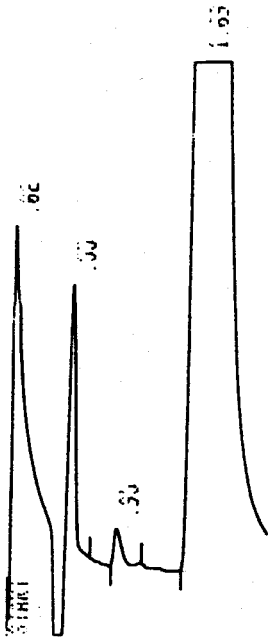
Figura 25.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno a etileno por las cepas RSP9MJ (A), RSP9MJ-5P (B), RSP10MJ (C) y RSP10MJ-34P (D).



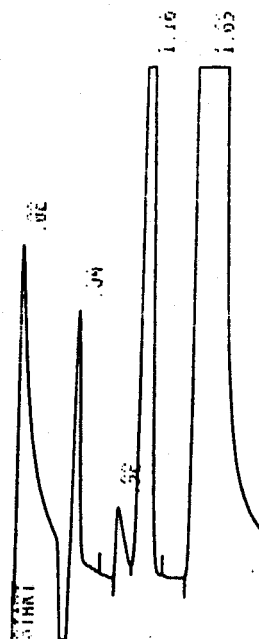
A



B

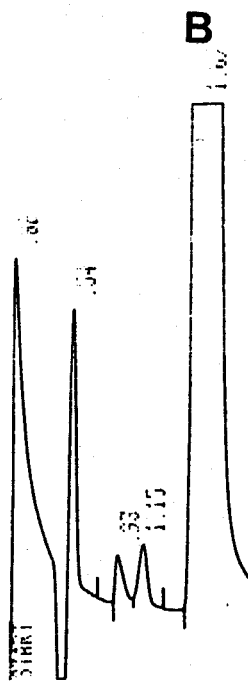
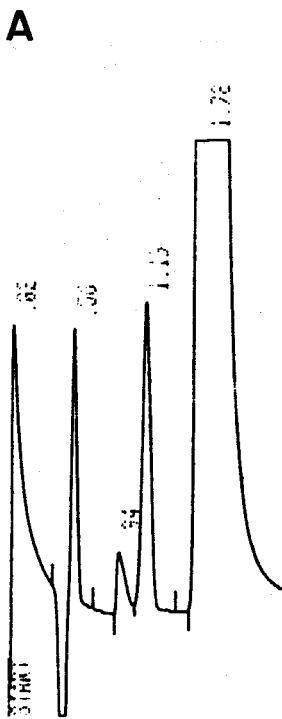
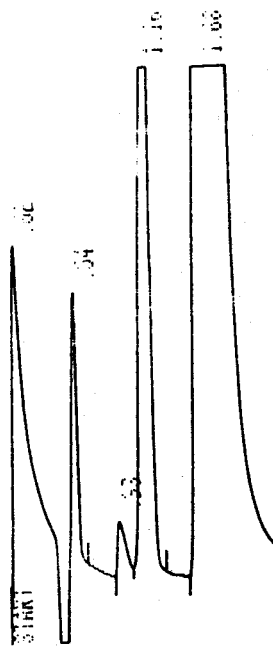
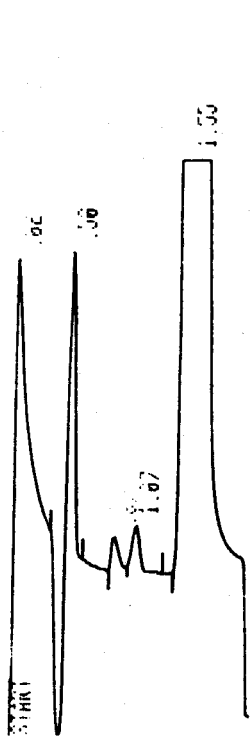


C



D

Figura 26.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno a etileno por las cepas RSP21MJ (A), RSP21MJ-2P (B), RSP21MJ-5P (C) y RSP21MJ-34P (D).



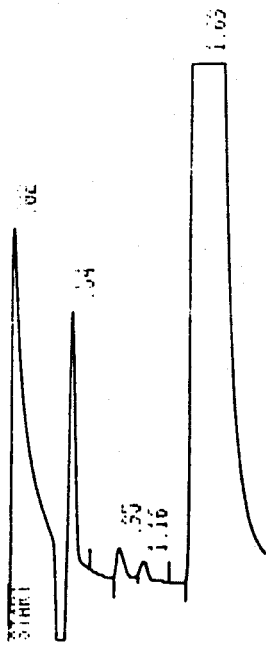
C

D

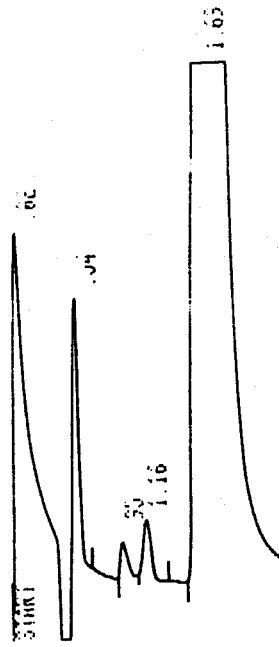
A

B

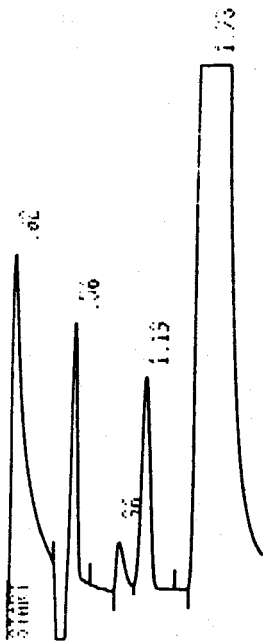
Figura 27.- Cromatogramas reultantes de la reducci3n de acetileno a etileno por las cepas RSP29MJ (A), RSP29MJ-5P (B), RSP29MJ-15P (C) y RSP29MJ-34P (D).



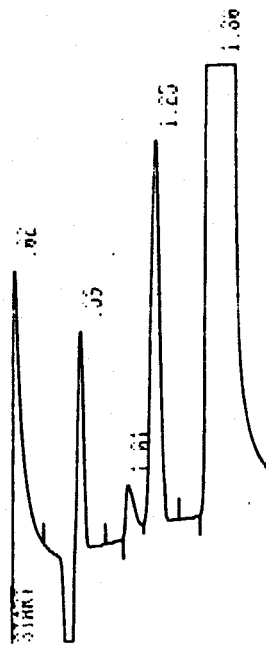
A



B



C



D

4.1.3. ANALISIS POR C.L.A.R. DE LOS MUTANTES COMPLEMENTADOS

A los transconjugantes complementados que formaron nódulos en planta se les determinó la composición cualitativa mediante cromatografía líquida.

La cepa RSP9MJ-5P (Figura 28-B) presenta un pico a un tiempo de retención de 21,04 minutos que no aparece en el cromatograma del mutante de procedencia y que parece corresponder a succínico, según se refleja en la Figura 6.

El transconjugante RSP10MJ-34P (Figura 29-B), contiene ácido acético en la estructura de su EPS, que no parecía poseerlo el mutante (Figura 29-A).

El área del pico del ácido pirúvico en las cepas RSP21MJ complementadas (Figura 30) es variable respecto al mutante.

El mutante RSP29MJ presentaba una inusual cantidad de ácido acético que se ha corregido con la introducción de los cósmidos indicados (Figura 31) y en el cromatograma del EPS complementado por pD15 (Figura 31-C) se muestra un perfil inusual con alto contenido en ácido pirúvico.

5. SELECCION DE MUTANTES COMPLEMENTADOS POR LA PLANTA HOSPEDADORA

A partir de la masa de conjugación, y no de una colonia aislada, se realizó un ensayo de nodulación con todos los transconjugantes obtenidos. En la Tabla XI y Figuras 32 a 36

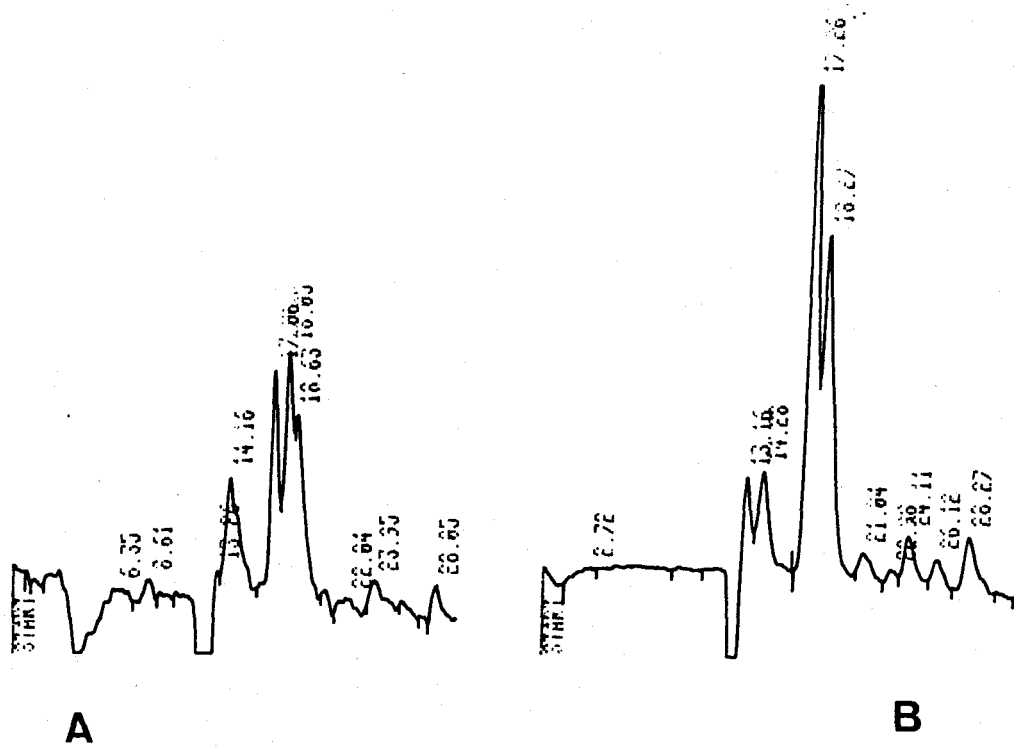


Figura 28.- Cromatogramas líquidos del EPS de las cepas RSP9MJ (A) y RSP9MJ-5P (B).

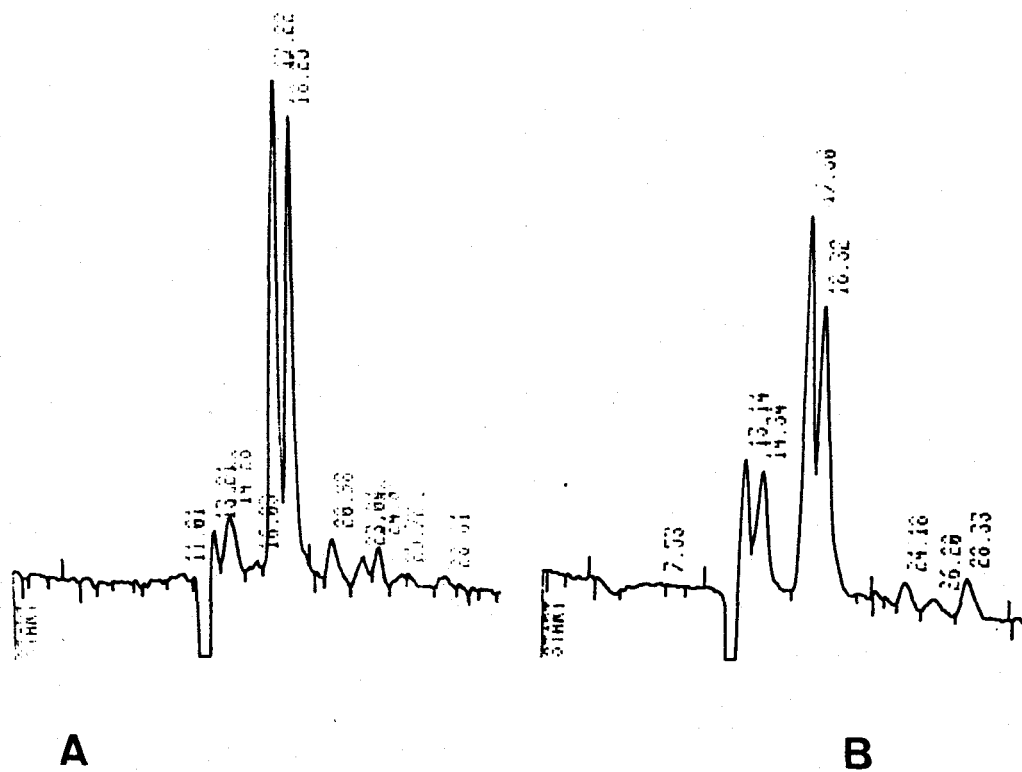
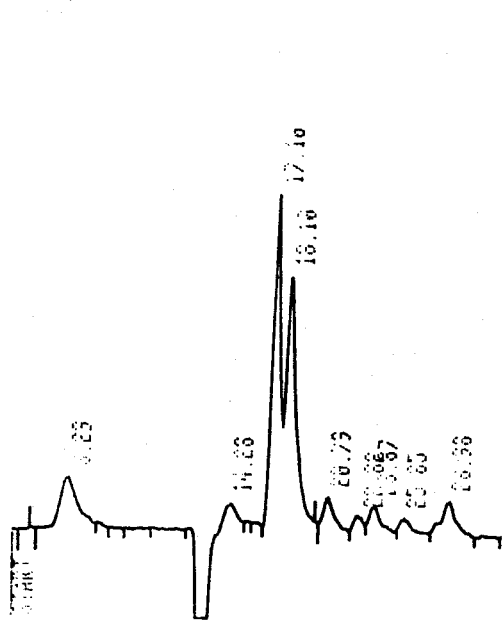
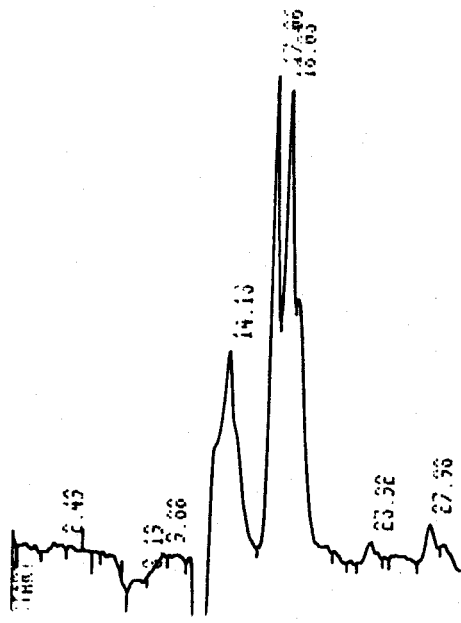


Figura 29.- Cromatogramas líquidos del EPS de las cepas RSP10MJ (A) y RSP10MJ-34P (B).

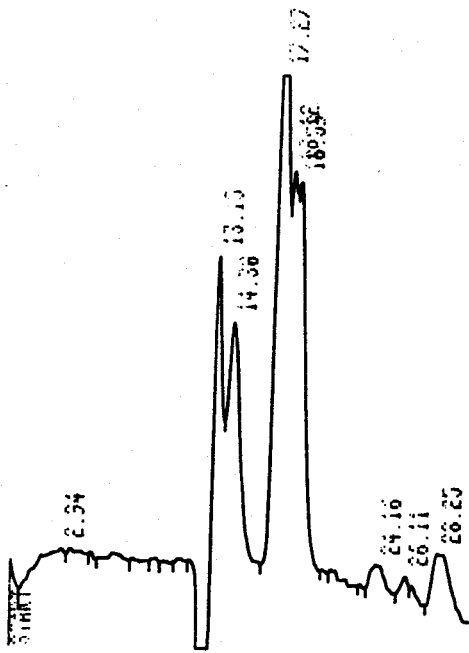
Figura 30.- Cromatogramas líquidos del
EPS de las cepas RSP21MJ (A),
RSP21MJ-2P (B), RSP21MJ-5P
(C) y RSP21MJ-34P (D).



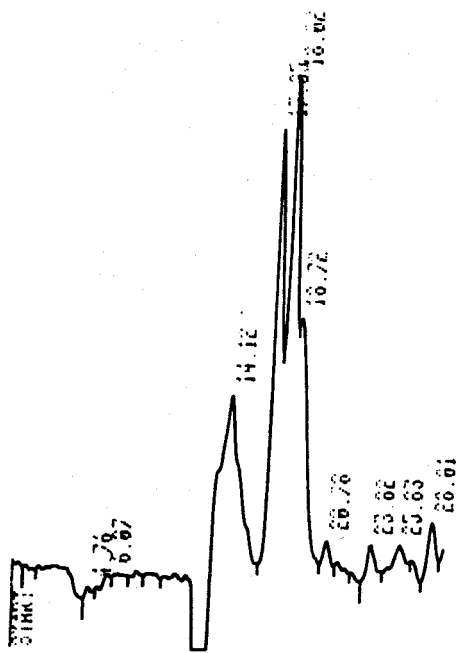
A



B

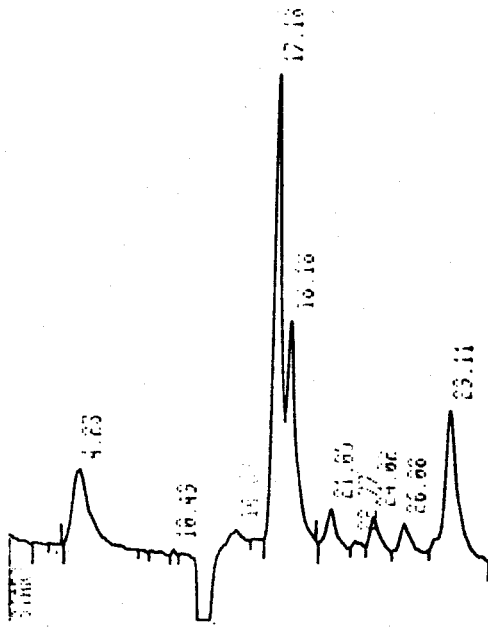


C

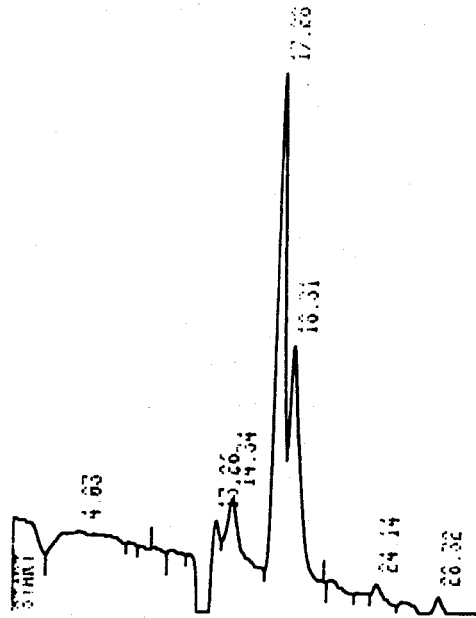


D

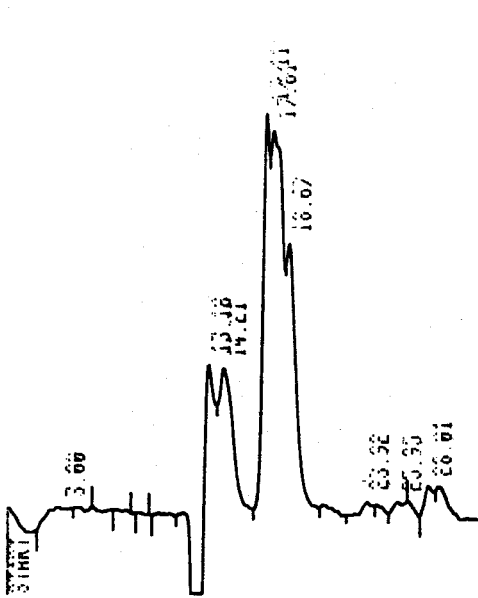
Figura 31.- Cromatogramas líquidos del
EPS de las cepas RSP29MJ (A),
RSP29MJ-5P (B), RSP29MJ-15P
(C) y RSP29MJ-34P (D).



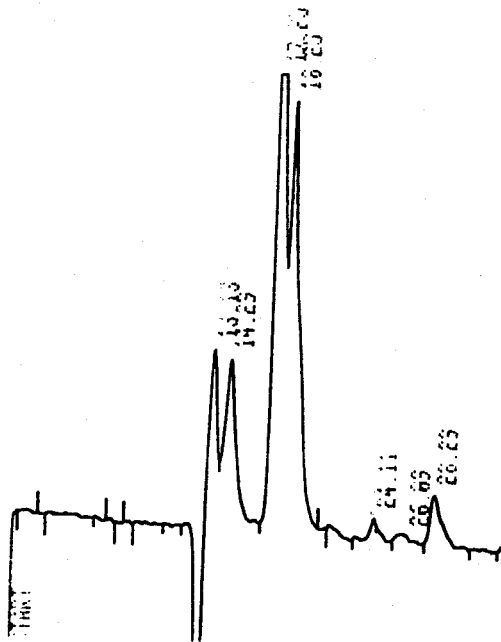
A



B



C



D

TABLA XI Selección de mutantes complementados por la planta hospedadora.

| <u>C E P A</u> | <u>NODULACION</u> | <u>Nº DE NODULOS</u> | <u>FIJACION</u> | <u>% FIJACION</u> |
|----------------|-------------------|----------------------|------------------|-------------------|
| RSP4MJ-2 | Nod ⁺ | 3 nod/planta | Fix ⁺ | 33,11 |
| RSP4MJ-34 | Nod ⁺ | 9 nod/planta | Fix ⁻ | 2,67 |
| RSP9MJ-5 | Nod ⁺ | 3 nod/planta | Fix ⁻ | 4,43 |
| RSP21MJ-5 | Nod ⁺ | 3 nod/planta | Fix ⁻ | 2,05 |
| RSP30MJ-5 | Nod ⁺ | 8 nod/planta | Fix ⁺ | 15,30 |
| RSP30MJ-34 | Nod ⁺ | 4 nod/planta | Fix ⁻ | 2,46 |
| RSP44MJ-5 | Nod ⁺ | 20 nod/planta | Fix ⁻ | 4,10 |

se resumen los resultados obtenidos tanto en el test de nodulación como en los cromatogramas de fijación de nitrógeno. Se puede observar en ellas, que sólo las cepas RSP4MJ-2 (Figura 32-B) y RSP30MJ-5 (Figuras 35-B y 41-C) formaron nódulos fijadores en las raíces de frijol.

Las cepas RSP4MJ-34 (Figura 32-C), RSP9MJ-5 (Figura 33-B), RSP21MJ-5 (Figura 34-B), RSP30MJ-34 (Figuras 35-C y 41-C) y RSP44MJ-5 (Figura 36-B y 42-B) formaron nódulos no fijadores en planta.

El resto de los transconjugantes presentaron el mismo fenotipo que el mutante del que procedían.

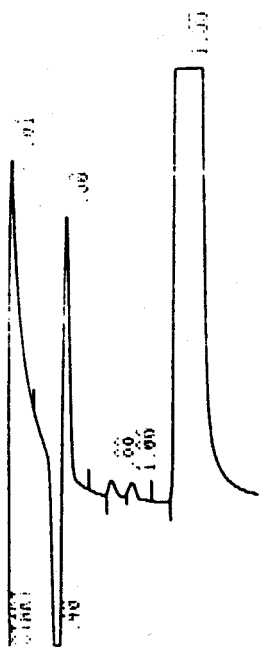
5.1. REAISLAMIENTO DE NODULOS

A partir de los nódulos obtenidos en todos los ensayos se reaislaron bacterias tal como se describe en el Apartado 6 de Métodos.

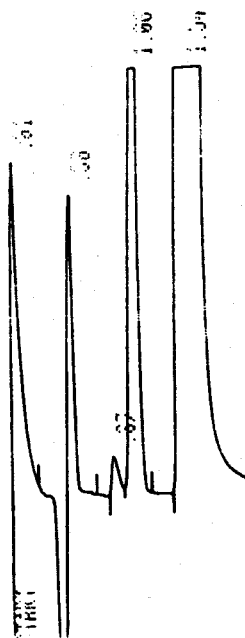
Las bacterias se sembraron simultáneamente en medios con y sin los antibióticos adecuados.

En todos los casos, las cepas aisladas presentaron el mismo patrón de resistencia que los transconjugantes obtenidos.

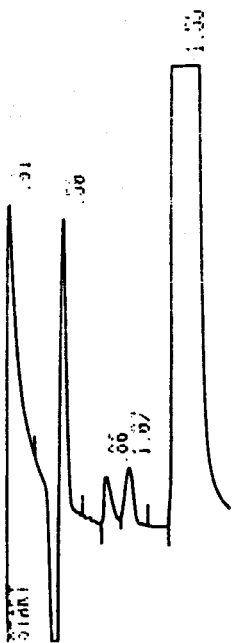
Figura 32.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno a etileno por las cepas RSP4MJ (A), RSP4MJ-2 (B) y RSP4MJ-34 (C).



A



B



C

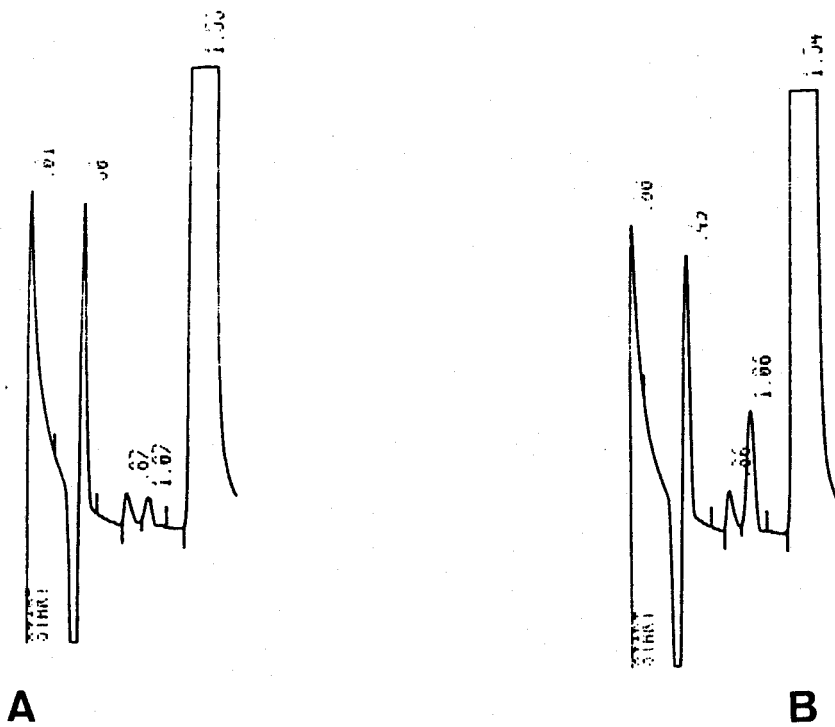


Figura 33.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno a etileno por las cepas RSP9MJ (A) y RSP9MJ-5 (B).

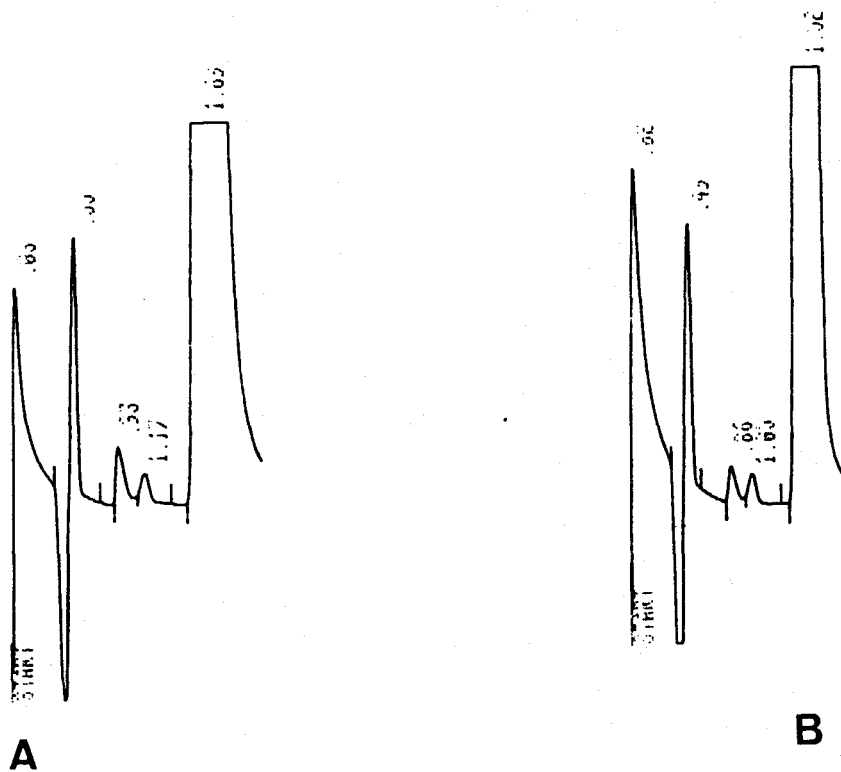
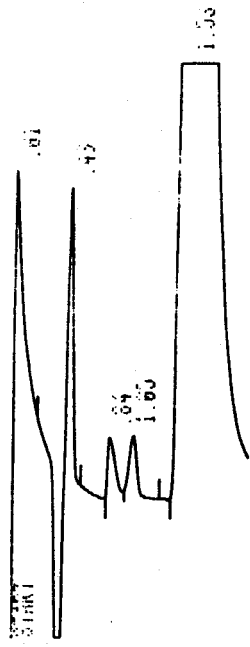
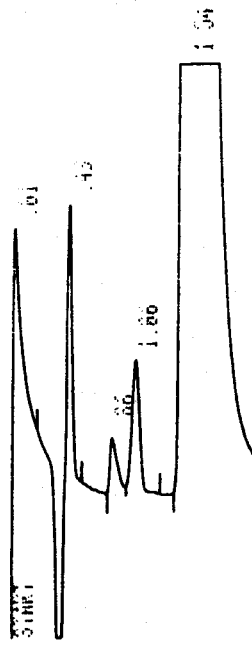


Figura 34.- Cromatogramas resultantes de la reducción de etileno a acetileno por las cepas RSP21MJ (A) y RSP21MJ-5 (B).

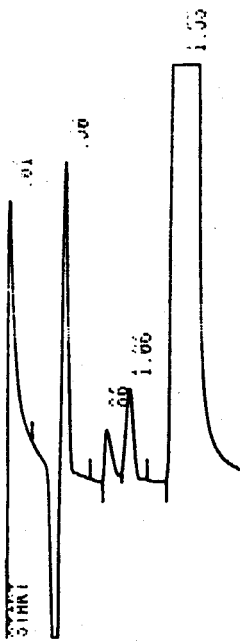
Figura 35.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno a etileno por las cepas RSP30MJ (A), RSP30MJ-5 (B) y RSP30MJ-34 (C).



A



B



C

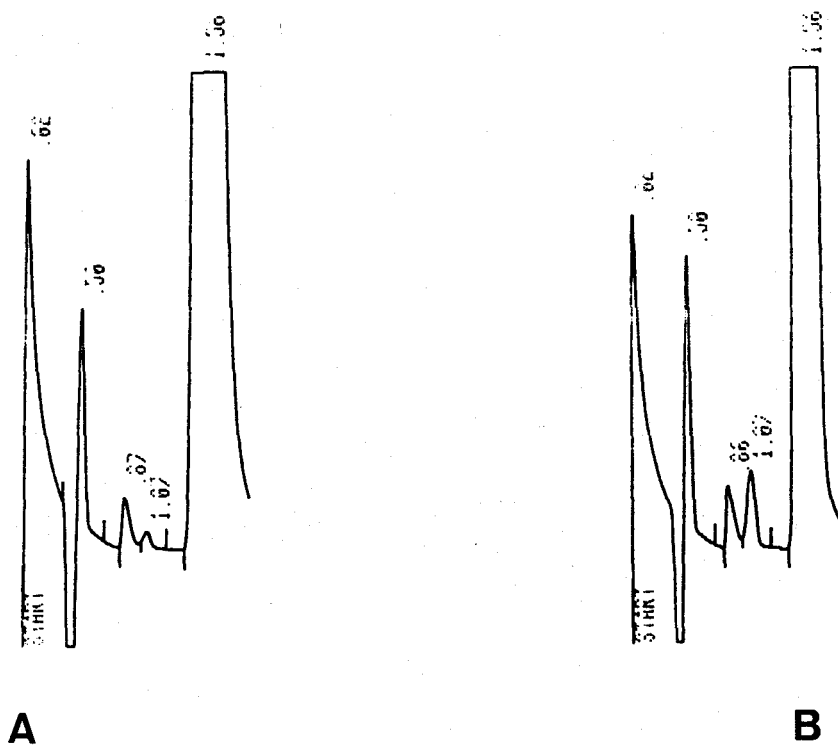


Figura 36.- Cromatogramas resultantes de la reducción de acetileno a etileno por mutante RSP44MJ (A) y por el transconjugante RSP44MJ-5 (B).

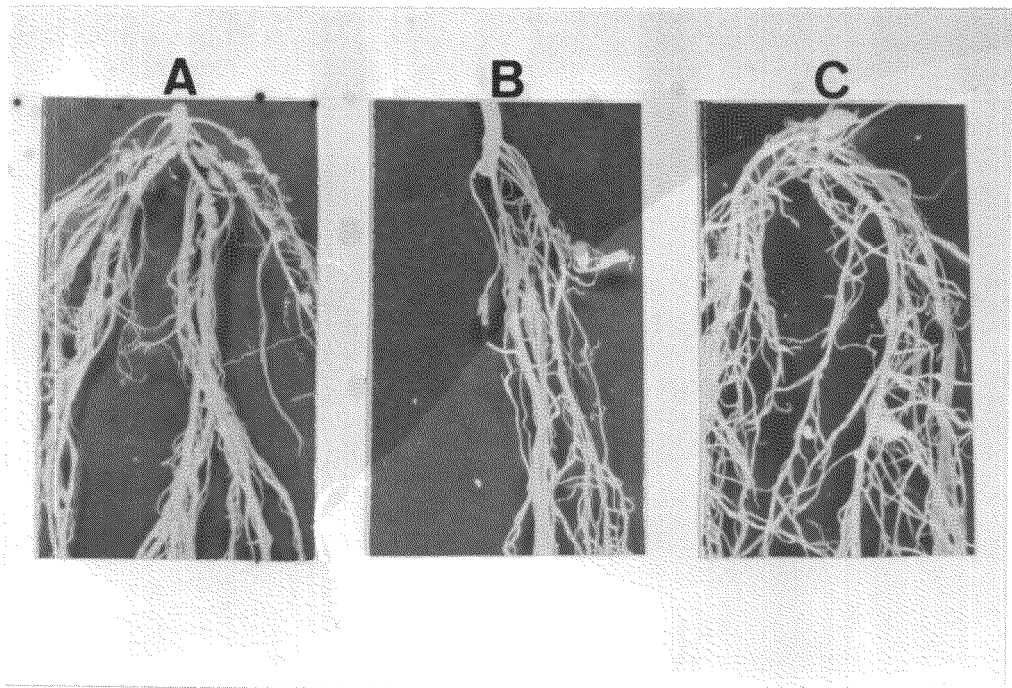


Figura 37.- Raíces de plantas inoculadas con las cepas CIAT899 (A), RSP1MJ (B) y RSP25MJ (C).

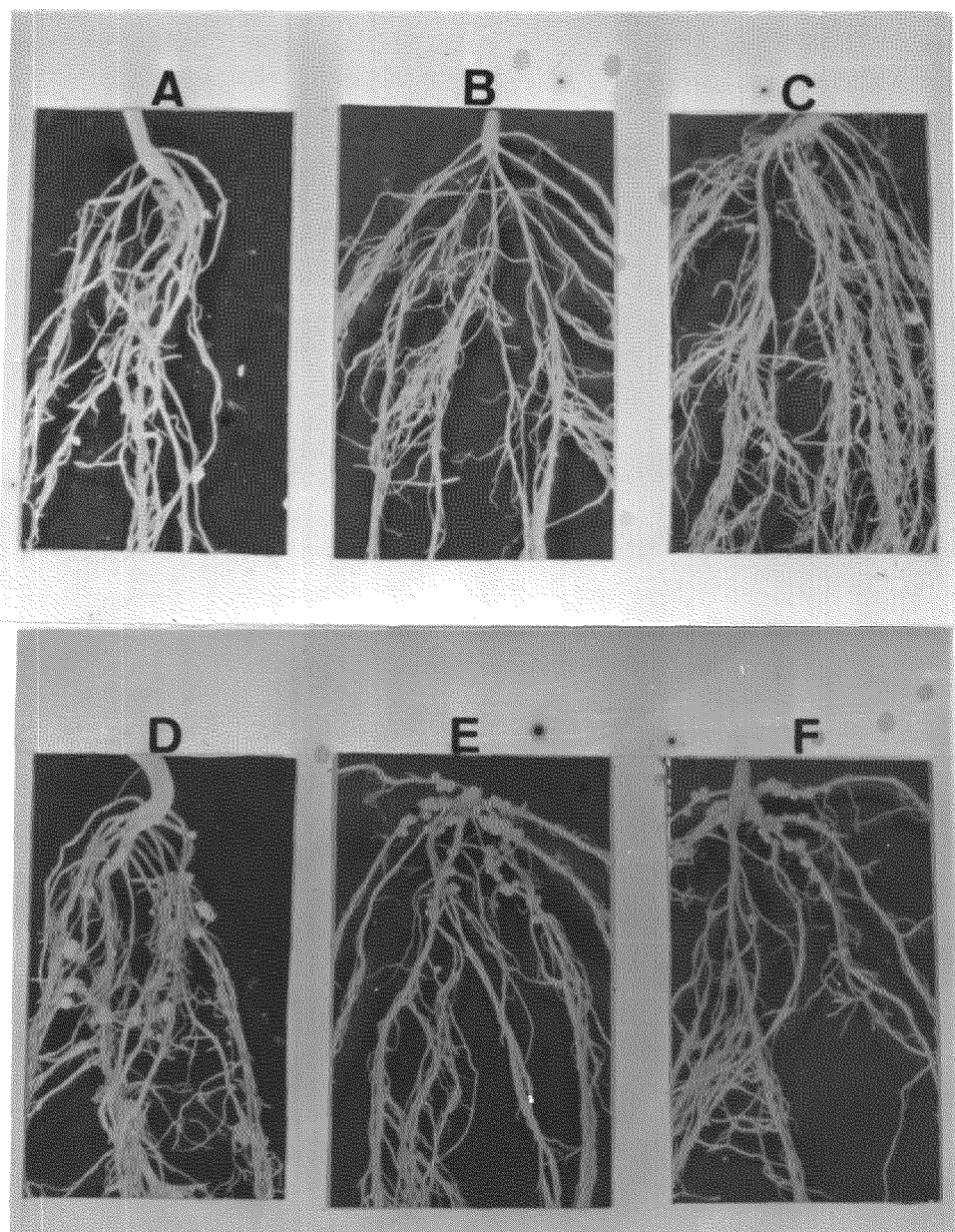


Figura 38.- Raíces de las plantas inoculadas con las cepas RSP4MJ (A), RSP9MJ (B), RSP10MJ (C), RSP4MJ-34 (D), RSP9MJ-5P (E) y RSP10MJ-34P (F).

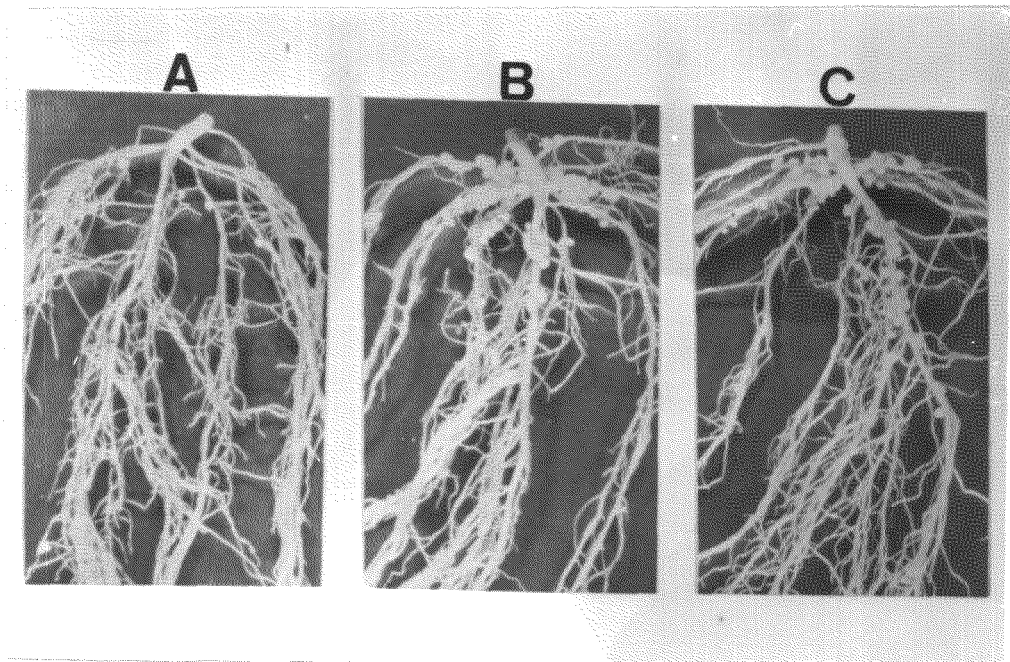


Figura 39.- Raíces de las plantas inoculadas con las cepas RSP21MJ (A), RSP21MJ-2P (B) y RSP21MJ-5P (C).

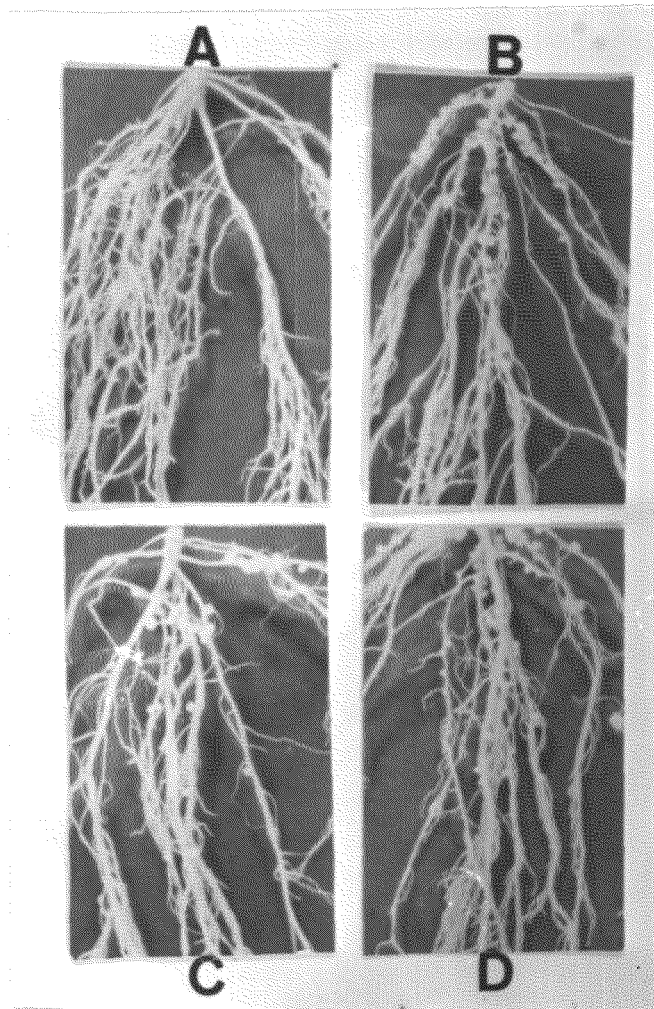


Figura 40.- Raíces de las plantas inoculadas con las cepas RSP29MJ (A), RSP29MJ-5P (B), RSP29MJ-15P (C) y RSP29MJ-34P (D).

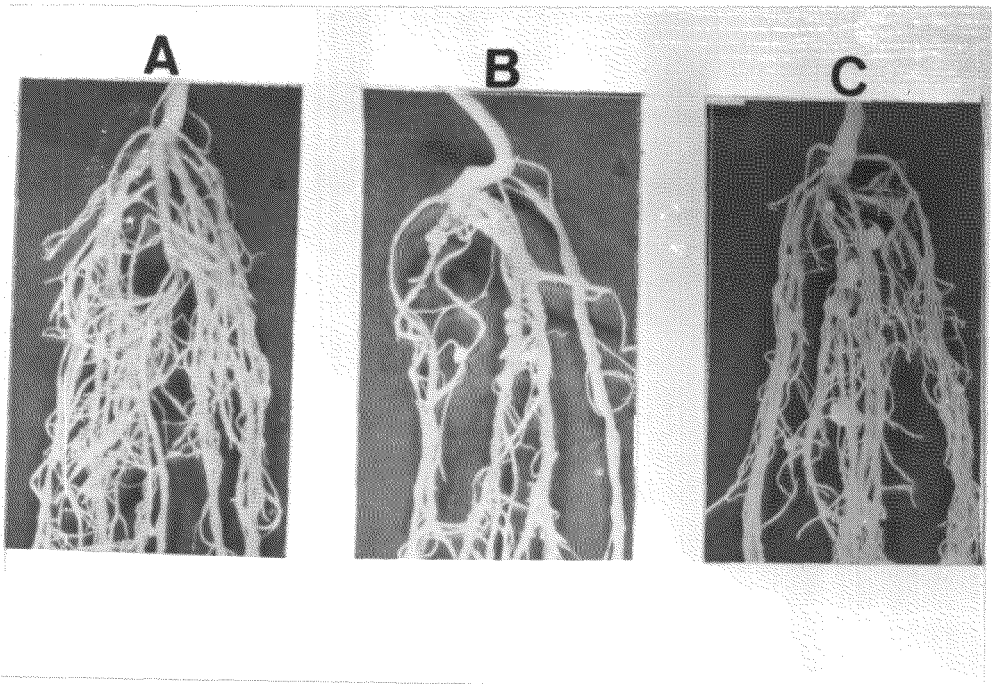


Figura 41.- Raíces de las plantas inoculadas con las cepas RSP30MJ (A), RSP30MJ-5 (B) y RSP30MJ-34 (C).

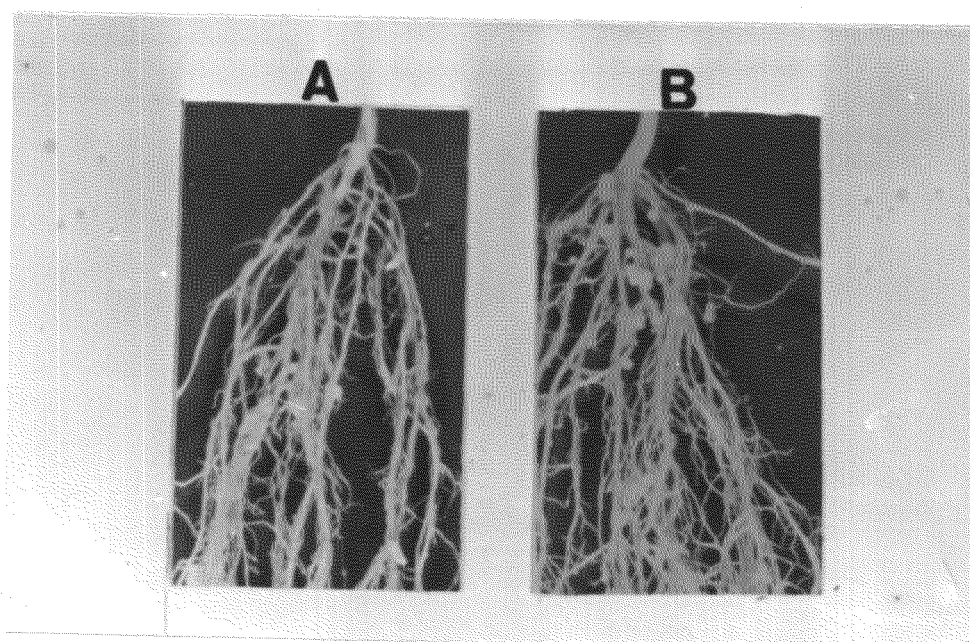


Figura 42.- Raíces de las plantas inoculadas con las cepas RSP44MJ (A) y RSP44MJ-5 (B).

VI DISCUSSION

La compleja interacción simbiótica entre los rizobios y las plantas leguminosas específicas, está controlada por una gran cantidad de genes que culminan con la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las plantas que infectan (Djordjevic y col., 1987a).

Existen fuertes evidencias que indican la participación de los genes responsables de la biosíntesis de EPS en el proceso de infección (Long, 1989) y posiblemente en la especificidad de rango (Philip-Hollingsworth y col., 1989).

Los EPS son complejos polímeros de azúcares excretados por rhizobia que constituyen la cápsula de la superficie celular.

Los mutantes de varias especies de *Rhizobium* que pierden la capacidad de producir EPS (mutantes Exo⁻) están, a menudo caracterizados por la baja infectividad para la formación de nódulos fijadores (Chen y col., 1985).

Los mutantes Exo⁻ tienen muy poca capacidad de penetración de la bacteria en el pelo radical o de colonización del tejido de la raíz, aunque se conserva la facultad de inducir nódulos meristemáticos (Finan y col., 1985).

Hasta el momento, en algunas especies, están muy avanzados los conocimientos que se tienen sobre la organización génica de los genes responsables de la síntesis del EPS, aunque la participación de los mismos en los procesos del establecimiento del nódulo está muy discutida.

En la Tabla XII se muestra un resumen de todos los genes

TABLA XII Resumen de todos los genes hasta ahora descritos que intervienen en

la biosíntesis de EPS.

| E S P E C I E | G E N | GEN SINONIMO | LOCALIZACION | PRODUCCION DE EPS POR MUTANTES | CARACTERISTICAS | | OBSERVACIONES |
|--------------------|-------------|-------------------------------------|-----------------|--|---|--|---|
| | | | | | SIMBIOTICAS DE LOS MUTANTES | F U N C I O N | |
| <i>R. meliloti</i> | <i>exoA</i> | | 2Q megaplásmido | Se afecta EPSI y EPSII | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | | LPS y β-glucanos normales |
| | <i>exoB</i> | | 2Q megaplásmido | Se afecta EPSI y EPSII | Nódulos Fix ⁻ vacíos y Fix ⁺ a largo plazo. | Deficientes en síntesis de UDP- glucosa-epimerasa. | LPS alterado. β-glucanos normales. |
| | <i>exoC</i> | | Cromosómico | Se afecta EPSI y EPSII | Nod ⁺ Fix ⁻ a largo plazo. | | LPS alterado. β-glucanos no existen |
| | <i>exoD</i> | | Cromosómico | EPSI y EPSII dependen del medio de cultivo. | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | El fenotipo sim- biótico no es de- bido a la poca producción de EPS | LPS y β-glucanos normales. |
| | <i>exoF</i> | <i>exoY</i> (NGR234) <i>pss2</i> | 2Q megaplásmido | Se afecta EPSI y EPSII | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | | |
| | <i>exoG</i> | | 2Q megaplásmido | No produce EPSI. Sólo produce EPSII (1/10 del silvestre) | Nódulos Fix ^{+/-} | Es un gen inhibi- torio sobre <i>exoX</i> y <i>exoH</i> . No afecta a <i>exoP</i> . | LPS y β-glucanos normales. |
| | <i>exoH</i> | | 2Q megaplásmido | EPSI modificado. EPSII trazas. | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | Inhibidor de la síntesis. | LPS y β-glucanos normales. EPS sin succínico. |
| | <i>exoI</i> | | 2Q megaplásmido | Disminuye EPSI (1/10 del silvestre). | Nódulos Fix ⁺ | | |
| | <i>exoK</i> | | 2Q megaplásmido | Produce EPS modifica- do. Menor cantidad. | Nódulos Fix ⁺ | | |
| | <i>exoL</i> | | 2Q megaplásmido | No produce EPSI. | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | | |

.../...

| E S P E C I E | G E N | GEN SINONIMO | LOCALIZACION | PRODUCCION | CARACTERISTICAS | F U N C I O N | OBSERVACIONES |
|---------------|-------------|-----------------------------|-----------------|--|--|--|---------------|
| | | | | DE EPS POR MUTANTES | SIMBIOTICAS DE LOS MUTANTES | | |
| | <i>exoM</i> | | 2Q megaplásmido | Produce poco EPSI. | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | | |
| | <i>exoN</i> | | 2Q megaplásmido | Disminuye EPSI (1/5 del silvestre). | Nódulos Fix ⁺ | | |
| | <i>exoP</i> | | 2Q megaplásmido | Produce poco EPSI. | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | Regulado por <i>exoR</i> y <i>exoQ</i> . | |
| | <i>exoQ</i> | | 2Q megaplásmido | No produce EPSI. | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | | |
| | <i>exoR</i> | | Cromosómico | Afecta EPSI. | Inf ⁻ | Reguladores. Transcriben <i>exoF</i> y <i>exoP</i> . | |
| | <i>exoS</i> | | Cromosómico | Afecta EPSI. | Nódulos Fix ⁺ | Reguladores. Transcriben <i>exoF</i> y <i>exoP</i> . | |
| | <i>exoT</i> | | 2Q megaplásmido | No produce EPSI. | Nódulos Fix ⁻ vacíos. | | |
| | <i>exoX</i> | psi <i>exoX</i> (NGR234) | 2Q megaplásmido | Se incrementa. | Nódulos Fix ⁺ | Regulador. Es re- gulado por <i>exoF</i> . | |
| | <i>exoY</i> | <i>exoY</i> (NGR234) | 2Q megaplásmido | | Nódulos Fix ⁺ a largo plazo. | Regulador. | |
| | <i>exoV</i> | | 2Q megaplásmido | | | | |
| | <i>exoW</i> | | 2Q megaplásmido | | | | |

de biosíntesis de EPS descritos hasta el momento para *R. meliloti* relacionándolos con los identificados en otras especies.

En el presente trabajo, se aislaron y caracterizaron 9 mutantes de producción de EPS obtenidos por transposición con Tn5.

La frecuencia de transposición alcanzada es similar a las aportadas por otros autores (Denny y col., 1988; Djordjevie y col., 1988; Kine y col., 1989; etc.).

Mediante la utilización de los cósmidos portadores de genes *exo* de *R. meliloti* pD2 (*exoB*), pD5 (*exoD*), pD15 (*exoC*) y pD34 (*exoA, M, N, P, L, K, H*) (Leigh y col., 1985), se trató de estudiar a qué grupos de complementación pertenecían los mutantes aislados.

Los cósmidos pD2 y pD34 se encuentran en el segundo megaplásmido de *R. meliloti* Rm1021 y no son cósmidos solapados. pD5 y pD15 son cromosómicos e igualmente no son cósmidos solapados.

Para la caracterización fenotípica de los mutantes obtenidos, no se utilizó la unión del EPS inducido por el mutante al calcofluor, porque cuando se iluminaba con luz U. V., el fenotipo de los mutantes era pleiotrópico respecto al brillo con el colorante, por lo que se descartó "a priori" esta posibilidad ampliamente seguida para la identificación inicial de mutantes en *R. meliloti*. Para el estudio inicial de los mismos, se procedió a realizar un análisis del fenotipo de la colonia en medio 79 de Allen. A este respecto

es interesante indicar que otros autores (Denny y col., 1985; Barbour y Elkan, 1989, etc.) han utilizado este método aunque el criterio seguido para la clasificación y nomenclatura de los fenotipos identificados ha sido muy variable. En nuestros resultados, en ningún caso se ha obtenido una colonia totalmente rugosa indicativa de ausencia total de biosíntesis de EPS, en contraposición con los identificados para *Pseudomonas solanacearum* (Denny y col., 1988); *Erwinia stewartii* (Dolph y col., 1988); *R. meliloti* (Leigh y col., 1985); etc.

Todos los mutantes estudiados presentan disminuida la cantidad de EPS producido, pero en ningún caso existe una ausencia total del mismo; este hecho podría indicar, en parte, el comportamiento pleiotrópico observado en presencia de calcofluor, fijando aunque parcialmente el colorante y no encontrándose un claro fenotipo sin brillo. El hecho de que no se aislaran mutantes que no produjeran EPS y que existan variaciones en sus características simbióticas, nos induce a especular que la cantidad de EPS producida juega un papel importante en el establecimiento de la simbiosis en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Por otro lado, las variaciones estructurales en la relación glucosa:galactosa encontradas en el EPS no parece jugar un papel importante en la función simbiótica, pues mutantes tales como RSP4MJ, RSP9MJ, RSP29MJ y RSP30MJ con relación (2,5:1 ó 2,7:1) presentan un comportamiento diferente en las propiedades simbióticas; así RSP29MJ es Nod-

y los mutantes RSP4MJ, RSP9MJ y RSP30MJ forman nódulos blancos y pequeños y todos disminuyen la fijación de nitrógeno respecto a la cepa silvestre.

Este comportamiento podría indicarnos que en el mutante RSP29MJ estuviesen alteradas otras estructuras superficiales que fuesen la causa de la pérdida de la capacidad de nodular.

Respecto a la apreciación inicial de presencia o ausencia de acético, en la molécula de EPS el comportamiento es muy heterogéneo y necesita estudios más profundos que nos establezca su cuantificación, aunque sí llama la atención, que en ningún caso estas mutaciones hayan inducido un fenotipo no nodulante.

La estrategia de complementación con los cósmidos de *R. meliloti* portadores de genes *exo*, fué doble: primeramente se estudió la morfología de las colonias de los mutantes obtenidos y posteriormente, se realizó la complementación en planta. Esta estrategia obedece a no descartar la posibilidad de que puedan existir complementaciones en la producción de EPS y que no fuesen encontradas por complementación en planta o viceversa.

A los mutantes complementados por morfología se les estudió la producción y composición del EPS y las características simbióticas, mientras que a los complementados por planta, inicialmente sólo se les han estudiado las características simbióticas de los mismos.

De los resultados obtenidos, cabe destacar claramente que no se han complementado las características simbióticas

en los mutantes RSP1MJ y RSP25MJ.

El mutante RSP1MJ

El mutante RSP1MJ presenta un fenotipo Nod⁻ con una reducción importante de la producción de EPS (20% del silvestre). La estructura del EPS "a priori" es normal y en placa de medio 79 de Allen se aprecian algunas colonias teóricamente complementadas por los cósmidos pD5, pD15 y pD34 que no indujeron un incremento de la producción de EPS ni restablecieron las características simbióticas. Se necesitan estudios más exhaustivos para poder establecer una relación entre la disminución de producción de EPS y el fenotipo simbiótico. Además, como indican otros autores, estos defectos fenotípicos pueden ser debidos a otros componentes superficiales como β -glucanos y LPS (Leigh y col., 1988).

En *R. meliloti* solamente los mutantes *exoR* dan un fenotipo Nod⁻ que afectan a la producción de EPS por influir en la transcripción de los genes *exoF* y *exoP*, como gen regulador (Doherty y col., 1988).

Este gen es cromosómico y no está representado en los cósmidos utilizados en nuestro trabajo, lo que justificaría que no se encontrara complementación con ninguno de ellos. Según estos datos, y muy preliminarmente, se podría indicar que la mutación afecta a un gen similar a *exoR*.

El mutante RSP25MJ

Este mutante induce la formación de nódulos blancos y pequeños con cierta fijación residual de nitrógeno.

Es el mutante *exo* que presenta la mayor producción de EPS (50%) y que en su estructura molecular se observa la ausencia de sustituciones de ácido acético. El hecho de que no presente complementación con los cósmidos utilizados, sería indicativo de que es un gen no representado en estos cósmidos.

Los mutantes RSP9MJ y RSP44MJ

Este mutante complementa con el cósmido pD5 de que porta el gen *exoD* de *R. meliloti*, restaurándose la capacidad simbiótica y no así la producción de EPS, aunque los nódulos obtenidos siguen siendo Fix⁻. La estructura del EPS complementado indica la aparición de un posible pico relacionado con el ácido succínico que es característico del EPS de *R. meliloti* (Long y col., 1988). La variación en la relación glucosa:galactosa entre los mutantes RSP9MJ (2,7:1) y RSP44MJ (3:1) no es indicativa de un cambio estructural.

Dado que los resultados obtenidos coinciden con las propiedades de los mutantes *exoD* de *R. meliloti* (cromosómico, producción de EPS dependen del medio de cultivo, nódulos vacíos Fix⁻, LPS y β -glucanos normales y la apreciación de que el fenotipo simbiótico no es debido a la producción de

EPS, Leigh y col., 1988), estos mutantes podrían estar afectados en un gen similar al *exoD* de *R. meliloti*.

El mutante RSP10MJ

La complementación con el cósmido pD34 restaura la capacidad simbiótica del mutante en frijol, recupera hasta un 50% la capacidad de producir EPS y la ausencia de ácido acético en la estructura del EPS del mutante es claramente restablecido por el mismo.

En estos cósmidos están representados los genes *exoA*, *exoH*, *exoK*, *exoL*, *exoM*, *exoN* y *exoP*.

De las características fenotípicas de estos mutantes en *R. meliloti*, se destaca que los mutantes *ExoK* producen EPS modificado, los nódulos son *Fix⁺* (Long y col., 1988); *ExoL* no produce EPS (Long y col., 1988), Los mutantes en *exoN* de *R. meliloti* son fijadores de nitrógeno (Long y col., 1988).

Los genes *exoA*, *exoM* y *exoP* podrían ser claros candidatos para esta mutación, pero no existen datos suficientes que lo apoyen.

Por último, los mutantes de *R. meliloti* en el gen *exoH*, presentan un polisacárido modificado en los sustituyentes succínico del EPSI (Leigh y col., 1987) indicativo de que dicho gen participa en la biosíntesis del EPS produciendo la succinilación del mismo. El mutante estudiado presenta modificada la estructura del EPS, desaparece el pico correspondiente al ácido acético y aparece un pico a un

tiempo de retención correspondiente al ácido succínico (Figura 8-C) y cuando se introduce el cósmido se restablece la estructura normal del EPS.

Estos datos podrían ser significativos para aventurar la hipótesis de que la mutación estaría en un gen homólogo al *exoH* de *R. meliloti* que estuviese participando en funciones de acilación de la molécula del polímero.

El mutante RSP4MJ

Realizados los estudios de complementación, ningún cósmido introducido restauró la cantidad de EPS, salvo el pD34 que incrementó un 20% este valor.

El hecho de que exista una modificación en la relación glucosa:galactosa (2,5:1) era indicativo de que podría estar afectado algún enzima de la biosíntesis de EPS. Tras la complementación en planta, se restauró la capacidad de inducir nódulos efectivos cuando se introduce el cósmido pD2 (Nod⁺ Fix⁺) y nódulos inefectivos con pD34 (Nod⁺ Fix⁻).

El restablecimiento de la nodulación se realiza con el cósmido pD2. Este hecho es indicativo de que un gen análogo al *exoB* sería el afectado.

El gen *exoB* de *R. meliloti* es el responsable del enzima UDP-glucosa-epimerasa (Leigh y col., 1988); la mutación en el mismo induce la alteración en la síntesis de EPS, y formación de un LPS modificado (Leigh y col., 1988). Leigh y col. (1988) indica que la participación del EPS y LPS en la

invasión de la raíz para la producción de nódulos es similar. El hecho de que el mutante esté alterado en la relación glucosa:galactosa y que sea complementado por *exoB*, es indicativo de la alteración de un posible gen *exoB* u otros genes no conocidos que transcriban con dicho. Ahora bien, la complementación parcial con pD34 indica que posiblemente la expresión de algunos de los genes que lleva, quizás *exoM* o *exoP*, que participan en la síntesis de precursores octosacáridos para el EPS de *R. meliloti* (Zhan y col., 1990), pueden parcialmente restaurar el defecto inducido en el EPS del mutante, pero no en el LPS, por lo que se inducirían nódulos aunque no se restituya el fenotipo silvestre. Estos datos indicarían que en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899 es necesaria la participación del EPS y LPS en la obtención de nódulos efectivos.

El mutante RSP29MJ

Las características simbióticas de este mutante (no se producen nódulos) induce a pensar que la alteración genética afecta drásticamente a los componentes superficiales de la bacteria. En los mutantes de EPS estudiados en *R. meliloti*, solamente *exoR* da lugar a un fenotipo similar al indicado. La posibilidad de que este mutante fuese similar a *exoR* (gen regulador de la síntesis de EPS) queda descartada dado el carácter del propio gen que no debería ser complementado por más de un cósmido no solapado de *R. meliloti*.

Los mutantes *exoC* de *R. meliloti* tienen las siguientes características: son deficientes en la síntesis de EPS, tienen LPS modificado y los β -glucanos no se sintetizan, esta ausencia o modificación de estructuras superficiales conllevan a que la cepa sea inmóvil, falle en la unión a la célula de la raíz y por consiguiente su fenotipo es Nod⁺ Fix⁻ (Leigh y col., 1988).

Dado que, el mutante analizado complementa con el cósmido pD15 (*exoC*) y restablece parcialmente la síntesis de EPS y su fenotipo simbiótico es Nod⁺ Fix⁺, se puede sugerir que este mutante estaría alterado en un gen similar al *exoC* de *R. meliloti*.

El hecho de que complementa con los cósmidos pD34 (Nod⁺ Fix⁺) y pD5 (Nod⁺ Fix⁻) podría ser justificado por los fenotipos que inducen algunos de los genes que portan.

El cósmido pD34 lleva los genes *exoA*, *exoM*, *exoN*, *exoP*, *exoL*, *exoK* y *exoH* todos ellos participan en la biosíntesis del EPS y presentan LPS y β -glucanos normales.

La mutación en *exoC* debe afectar a una de las etapas iniciales de la biosíntesis de precursores de EPS, LPS y β -glucanos.

Por otro lado, la complementación en la síntesis de EPS por el cósmido pD34 es indicativo de que se complementan las funciones biosintéticas alteradas y posiblemente la utilización de restos biosintéticos inducidos por genes presentes en el cósmido de *R. meliloti* que no existen en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899.

El fenotipo Nod⁺ Fix⁻ inducido por el cósmido pD5 (*exoD*) puede ser igualmente justificado, ya que los mutantes en el gen *exoD* de *R. meliloti* presentan β -glucanos y LPS normales (Leigh y col., 1988), además la complementación de mutaciones *exoD* en *R. meliloti* han demostrado que el gen *exoD* restablece las características simbióticas del mutante aunque no se ve incrementada la capacidad de síntesis de EPS (Leigh y col., 1988).

Por lo tanto, una posible explicación sería que el producto del gen *exoD* restablezca la capacidad de síntesis de algunos de los componentes superficiales del mutante y se establezca una simbiosis inefectiva. Quizás la capacidad de inducir la síntesis de EPS previa a la infección en planta, podría justificar que no se haya encontrado complementación en planta por la masa de transconjugantes inoculados.

El mutante RSP21MJ

Este mutante, se complementa por pD2 (*exoB*) y pD5 (*exoD*) para nodulación y fijación de nitrógeno.

De los datos aportados por Leigh y col. (1988) se deduce que los genes *exoC*, *exoB* y *exoA* participan y quizás por este orden en la síntesis de EPS, LPS y β -glucanos. El hecho de que el mutante obtenido pueda ser complementado por ambos genes en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899 es indicativo de que la ruta biosintética en esta cepa sea muy diferente a la que ocurre en *R. meliloti*, pudiendo ser enzimas diferentes

que participan en vías alternativas en *R. meliloti* (quizás en la síntesis de los dos tipos de exopolisacaridos EPSI y EPSII), mientras que, en esta cepa sea un paso común y puede ser complementado a nivel de biosíntesis. Luego "a priori", se indica que este gen no sería identificable con los descritos para *R. meliloti*, pero sí semejante en su actividad a los genes *exoC* y *exoD* de *R. meliloti*.

El mutante RSP30MJ

Los datos de complementación en planta (pD5 confiere fenotipo Nod⁺ Fix⁺ y pD34 confiere fenotipo Nod⁺ Fix⁻) son indicativos de que la mutación afecta a un gen relacionado con *exoD* o que esté codificado en el mismo operón que éste y sea cotranscrito con él, aunque por los datos obtenidos de complementación parcial con pD34, no parece posible que sea *exoD* y que la complementación parcial se justifique por algunas de las posibilidades planteadas para el mutante RSP4MJ.

Evidentemente, los resultados obtenidos han permitido empezar a descifrar parte de los genes *exo* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, pero para confirmar las hipótesis planteadas de localización de genes *exo* en esta cepa se requieren investigaciones más profundas.

Con la Tabla XIII se resume la posible identificación de genes relacionados con la biosíntesis de estructuras superficiales según la discusión presentada.

TABLA XIII Resumen de la posible identificación de los genes relacionados con la biosíntesis de estructuras superficiales según la discusión presentada.

| MUTANTE | COSMIDOS QUE COMPLEMENTA | POSIBLE GEN RELACIONADO DE <i>R. MELILOTI</i> 1021 |
|---------|------------------------------|--|
| RPS1MJ | | <i>exoR</i> |
| RSP4MJ | pD2, pD34 | <i>exoB</i> |
| RSP9MJ | pD5 | <i>exoD</i> |
| RSP44MJ | pD5 | <i>exoD</i> |
| RSP10MJ | pD34 | <i>exoH</i> (?) |
| RSP21MJ | pD2, pD5, pD34 ^P | <i>exoC</i> , <i>exoD</i> |
| RSP25MJ | | <i>exo?</i> |
| RSP29MJ | pD15, pD34, pD5 ^P | <i>exoC</i> |
| RSP30MJ | pD5, pD34 ^P | <i>exoD</i> |

Es interesante indicar que en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899, están interrelacionados la síntesis de EPS, LPS y β -glucanos y que al igual que en *R. meliloti* Rm1021, estas tres estructuras poseen funciones diferentes pero necesarias durante la etapa de entrada en la planta para la realización del nódulo efectivo.

VII CONCLUSIONES

- 1.) La utilización de Tn5::*mob* como vehículo para la mutagénesis al azar, ha inducido la obtención de mutantes deficientes en la síntesis de EPS.
- 2.) Todos los mutantes aislados sintetizaron cantidades variables de EPS, aunque siempre inferiores a las producidas por la cepa silvestre y tienen alteradas sus características simbióticas.
- 3.) La complementación con cósmidos portadores de genes *exo* de *R. meliloti* Rm1021 no restablecen la producción total de EPS, mientras que si restituyen, en algunos casos, las características simbióticas.
- 4.) Las mutaciones responsables de los fenotipos deficientes en los componentes superficiales de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899 se han relacionado con genes *exo* de *R. meliloti* Rm1021, localizándose genes análogos a *exoB*, *exoC*, *exoD*, *exoH* y *exoR*.

VIII BIBLIOGRAFIA

- ABE, M., SHERWOOD, J.E., HOLLINGSWORTH, R.I., and DAZZO, F.B. 1980. Stimulation of clover root hair infection by lectin-binding oligosaccharides from the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii*. J. Bacteriol. 160: 517-520.
- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; and KARR, A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res. 5: 340-345.
- ALLEN, O.N. 1951. Experiments in soil bacteriology. Burgess Publish Ninnneapolis
- AMARGER, N., OBATON, N., and BLANCHERE, H. 1967. Polysaccharides extracellulaires de *R. meliloti*. Can. J. Microbiol. 13: 99-105.
- APPELBAUM, E.R., THOMPSON, D.V., IDLER, K., and CHARTRAIN, N. 1988. *Rhizobium japonicum* USDA191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. J. Bacteriol. 170: 12-20.
- BANFALVI, Z., SAKANYAN, V., KONCZ, C., KISS, A., DUSHA, I., and KONDOROSI, A. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. Mol. Gen. Genet. 184: 318-325.
- BARBOUR, W.M., and ELKAM, G.H. 1989. Relationship of the presence and copy number of plasmids to exopolysaccharide production and symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii* USDA206. Appl. Environ. Microbiol. 55: 813-918.
- BAUER, W.D. 1981. Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 407-449.
- BERINGER, J.E. 1974. R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198.
- BLAKE, J.D., and RICHARDS, G.N. 1970. A critical re-examination of problems inherent in compositional analysis of hemicelluloses by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res. 14: 375-387.
- BLAKENEY, A.B., HARRIS, P.J., HENRY, R.J., and STONE, B.A. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. Carbohydr. Res. 113: 291-299.
- BORTHAKUR, D., BARBER, C.E., LAMB, J.W., DANIELS, M.J., DOWNIE, J.A., and JOHNSTON, A.W.B. 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of pea by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *R.*

phaseoli and is corrected by cloned DNA from *Rhizobium* or the phytopatogen *Xantomonas*. Mol. Gen. Genet. 203: 320-323.

BORTHAKUR, D., DOWNIE, J.A., JOHNSTON, A.W.B., and LAMB, J.W. 1985. *psi*, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 200: 278-282.

BREWEN, N.J., BERINGER, J.E., BUCHANAN-WOLLANSTON, A.V., JOHNSTON, A.W.B. and HIRSCH, P.R. 1980. Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 116: 261.

CARLSON, R.W., HANLEY, B., ROLFE, B.G., and DJORDJEVIC, H.A. 1986. A structural comparison of the acidic extracellular polysaccharide from *Rhizobium trifolii* mutants affected in root hair infection. Ann. Rev. Physiol. 35: 243-275.

CAVIEDES, M.A., MEGIAS, M., GIL, A.M., PALOMARES, A.J., and RUIZ-BERRAQUERO, F. 1982. Correlation between extracellular polysaccharide composition and nodulation ability in *Rhizobium trifolii*. Arch. Microbiol. 133: 20-22.

CHAKRAVORTY, A.K., ZURKOWSKI, W., SHINE, J., and ROLFE, B.G. 1982. Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of *Rhizobium* genes involved in exopolysaccharide synthesis and effective nodulation. J. Mol. Appl. Gen. 1: 585-596.

CHEN, H., BATLEY, M., REDMON, J., and ROLFE, B.G. 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: 331-349.

DART, P.J. 1977. Infection and development of leguminous nodules. In: A treatise on dinitrogen fixation. Hardy, R.W.F., Silver, W.S. (eds), pp: 367-472. John Wiley, New York.

DARVILL, A.G., and ALBERSHEIM, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors, a defense against microbial infection in plants. Ann. Rev. Physiol. 35: 243-275.

DAZZO, F.B., TRUCHET, G.L., SHERWOOD, J.E., HRABAK, E.M., and GARDIOL, A.E. 1982. Alteration of the trifoliin A-binding capsule of *Rhizobium trifolii* 0403 enzymes released from clover roots. Appl. Environ. Microbiol. 44: 478-490.

- DENNY, T.P., FELISTER, W.M., and STEVENS, M.B. 1988. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* Tn5 mutants deficient in extracellular polysaccharide. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 1: 215-233.
- DHAESE, B., DE GROE, H., DECRAEMER, H., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M. 1979. Rapid mapping of transposon insertions and deletion mutation in the large Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 7: 1837-1849.
- DILWORTH, M.J., APPLEBY, C.A. 1979. Leghaemoglobin and *Rhizobium* hemoproteins. In: A treatise on dinitrogen fixation. Hardy, R.W.F., Bottonley, F., Burns, R.C. (eds), pp: 691-764. John Wiley, New York.
- DITTA, G. 1986. Tn5 mapping of *Rhizobium* nitrogen fixation genes. In: *Methods in Enzymology*, 118: 519-528.
- DJORDJEVIC, S.P., CHEN, H., BATLEY, M., REDMON, J.W., and ROLFE, B.G. 1987a. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp NGR234 and *R. trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 169: 53-60.
- DJORDJEVIC, M.A., GABRIEL, D.W., and ROLFE, B.G. 1987b. *Rhizobium*: The refined parasite of legumes. *Ann. Rev. Phytopatol.* 25: 145-168.
- DOHERTY, D., LEIGH, J., and WALKER, G.C. 1988. *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 170: 4249-4256.
- DOLPH, P.J., MAJERCZAK, D.R., and COPLIN, D.L. 1988. Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in *Erwinia stewartii*. *J. Bacteriol.* 170: 865-871.
- DUDMAN, W.F., FRANZEN, L.L., DARVILL, J.E., McNEIL, M., DARVILL, A.G. and ALBUSHEIM, P. 1983. *Carbohydr. Res.* 117: 141.
- DUDMAN, W.F. and HEIDELBERGER, W.F. 1969. *Science.* 164: 954.
- DYLAN, T., IELPI, L., STANDFIELD, S., KASHYAP, L., DOUGLAS, C., YANOFSKY, M., NESTER, E., HELINSKI, D.R., and DITTA, G. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4403-4407

- FEINBERG, A.P. and VOGELSTEIN, B. 1983. *Anal Biochem.* 132: 6-15.
- FINAN, T.M., HISCH, A.M., LEIGH, J.A., JOHANSEN, E., KULDAN, G.A., DEEGAN, S., WALKER, G.C., and SIGNER, E.R. 1985. Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell.* 140: 869-877.
- FINAN, T.M., KUNKEL, B., DE VOS, G.F., and SINGER, E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* 167: 66-72.
- GEREMIA, R.A., CAVAINAC, S., ZORREGUIETA, A., TORO, N., OLIVARES, J., and UGALDE, R.A. 1987. A *Rhizobium meliloti* mutants that form ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form B-1,2 glucan. *J. Bacteriol.* 169: 880-884.
- GIL-SERRANO, A., SANCHEZ DEL JUNCO, A., TEJERO-MATEO, P., MEJIAS, M., CAVIEDES, M.A. 1990. Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899. *Carbohydrate Research.* 204: 103-107.
- GLAZEBROOK, J., and WALKER, G.C. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56: 661-672.
- GOMORI, G. 1955. *Methods in Enzymology.* 1: 138-146.
- HALVERSON, L.J., and STACEY, G. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* 50: 193-225.
- HIGASHI, S. 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium japonicum* genome. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 391-403.
- HOOYKAAS, P.J.J., VAN BRUSEL, A.A.N., DEN DULK-RAS, H., VAN SLOGTEREN, G.M.S., and SCHILPEROORT, R.A. 1981. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature.* 291: 351-354.
- HORVATH, B., KONDOROSI, E., JOHN, M., SCHMIDT, J., TOROK, I., GYORGYPAL, Z., BARABAS, I., WIENEKE, U., SCHELL, J., and KONDOROSI, A. 1986. Organization structural and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell.* 46: 335-343.
- JACOB, A.E., CRESSWELL, J.L., HEDGES, R.W., COETZEE, J.N., and BERINGER, J.E. 1976. Properties of plasmid

- constructed by the in vitro insertion of DNA from *Rhizobium leguminosarum* or *Proteus mirabilis* into RP4. Mol. Gen. Genet. 147: 315-323.
- JORDAN, D.C. 1984. Family III - Rhizobiaceae CONN 1938. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 1: 234-246.
- KAMOUN, S., COOLEY, M.B., KOGOWSKY, P.M., and KADO, C.I. 1989. Two chromosomal loci involved in production of exopolysaccharide in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 171: 1755-1759.
- KEIM, T.T.V., TOUBART, P., LOUSSON, A., DARVILL, A.G., GOLLING, D.J., CHELF, P., and ALBERSHEIM, P. 1985. Manipulation of the morphogenetic pathway of tobacco explants by oligosaccharids. Nature. 314: 615-617.
- KIM, C.H., KUYKENDALL, L.D., SHAH, K.S., and KEISTER, D.L. 1988. Induction of symbiotically defective auxotrophic mutants of *Rhizobium fredii* HH103 by transposon mutagenesis. Appl. Environ. Microbiol. 54: 423-427.
- KOCH, B., and EVANS, J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant. Physiol. 41: 1748-1760.
- KONDOROSI, A., KONDOROSI, E., PANKHURST, C.E., BROUGHTON, W.J., BANFALVI, Z. 1982. Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. Mol. Gen. Genet. 188: 433-439.
- LEGOCKY, R.P., and VERNA, D.P. 1980. Identification of nodule-specific host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. Cell 20: 153-163.
- LEIGH, J.A., and LEE, C.C. 1988. Characterization of polysaccharide of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants that form ineffective nodules. J. Bacteriol. 170: 3327-3332.
- LEIGH, J.A., REED, J.W., HANKS, J.F., HIRSCH, A.M., and WALKER, G.C. 1987. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. Cell. 51: 579-587.
- LEIGH, J.A., SIGNER, E.R., and WALKER, G.C. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc. Natl.

Acad. Sci. 82: 6231-6235.

- LEONG, S.A., DITTA, G.S., and HELINSKI, D.R. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* 257: 8724-8730.
- LIBBENGA, K.R., and ROGERS, R.J. 1974. Root-nodule morphogenesis. In: *The biology of nitrogen fixation*. Quispel, A. (ed), pp: 430-471. North Holland. Amsterdam.
- LONG, S.R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56: 203-214.
- LONG, S., REED, J.W., HIMAWAN, J., and WALKER, G.C. 1988. Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170: 4239-4248.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- MC NEIL, M., DARVILL, J., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P., VAN VEEN, R., HOOYKAAS, P., SCHILPEROORT, R., and DELL, A. 1986. The discernible structural features of the acidic polysaccharide secreted by different *Rhizobium* species are the same. *Carbohydr. Res.* 146: 307-326.
- MARTINEZ, E., PARDO, M.A., PALACIOS, R., and CEVALLOS, M.A. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1779-1786.
- MOORE, W.E.C., and MOORE, L.V.H. 1989. *Index of the bacterial and yeast. Nomenclatural changes*. American Society for Microbiology, Washington.
- MORT, A.J. and BAUER, W.D. 1980. Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. Changes with culture age and correlation with binding of soybean seed lectin to the bacteria. *Plant Physiol.* 66: 158-163.
- MÜLLER, P., HYNES, M., KAAP, D., NIEHAUS, K., and PÜHLER, A. 1988. Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* 211: 17-26.
- NEWCOMB, W. 1980. Control of morphogenesis and differentiation of pea root nodules. *Nitrogen Fixation.* 2: 87-102.
- NUTI, M.P., LEPIDI, A.A., PRAKASH, R.K., SCHILPEROORT, R.A.,

- and CANNON, F.A. 1979. Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature*. 282: 533-535.
- PHILIP-HOLLINGSWORTH, S., HOLLINGSWORTH, R.I., DAZZO, F.B., and ROLFE, B.A. 1989. The effect of interspecies transfer of *Rhizobium* host-specific nodulation genes on acidic polysaccharide structure and in situ binding by host lectin. *J. Biol. Chem.* 264: 5710-5714.
- POSTGATE, J.R. 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge V.K.: Cambridge University Press.
- PRAKASH, R.K., SCHILPEROORT, R.A., and NUTI, M.P. 1981. Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. *J. Bacteriol.* 145: 1129-1136.
- PÜHLER, P., HYNES, M., KAPP, D., MÜLLER, P., and NIEHAUS, K. 1986. Infection mutants of *Rhizobium meliloti* are altered in acidic exopolysaccharide production. In: Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions. Lugtenberg, B. (ed). NATO ASI series. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- SANCHEZ DEL JUNCO, A. 1990. Estudio estructural del exopolisacárido producido por *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* CIAT899. Tesis de licenciatura.
- SANDERS, R., RALEIGH, E., and SIGNER, E. 1981. Lack of correlation between extracellular polysaccharide and nodulation ability in *Rhizobium*. *Nature*. 292: 148-149.
- SCOTT, J.E. 1965. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salt. *Methods in carbohydrate Chem.* 5: 38-44.
- SEVILLANO, F., y RODRIGUEZ BARRUECO, C. 1987. Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en agricultura. En: Avances en la biología de la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico. Megías, M. y Ruiz berraquero, F. (ed), pp: 11-29. Sevilla.
- SIMON, R., PRIEFER, V., and PÜHLER, A. 1983. Vector plasmids for in-vivo and in-vitro manipulations of gram-negative bacteria. In: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. Pühler, A. (ed), pp: 98-105. Springer-Verlag. Berlin.
- SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V., and SNEATH, P.H.A. 1989. Approved lists of bacterial names. American Society for Microbiology. Washinton.

- SKORUPSKA, A., DERYLO, M., and LORKIEWICZ, Z. 1985. Role of noncarbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. Arch. Microbiol. 143: 307-310.
- SOLHEIM, B., and FJELLHEIM, K.E. 1984. Rhizobial polysaccharide-degrading enzymes from roots of legumes. Physiol. Plant. 62: 11-17.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- SPRENT, J.I. 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? New Phytol. 111: 129-153.
- VALENT, B.S., DARVILL, A.G., McNEIL, M., ROBERTSEN, B.K., and ALBERSHEIM, P. 1980. A general and sensitive chemical method for sequencing the glycosyl residues of complex carbohydrates. Carbohydr. Res. 79: 165
- VANDENBOSCH, K.A., NOEL, K.D., KANECO, Y., and NEWCOMB, E.H. 1985. Nodule initiation elicited by noninfective mutants of *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. 162: 950-959.
- VINCENT, J.M. 1980. Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: Nitrogen fixation II. Newton, W.E., Orme-Johnson, W.H. (eds), pp: 103-129. University Park Press. Baltimore.
- ZHAN, H., and LEIGH, J.A. 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 172: 5254-5259.
- ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1971. Chemical composition of exopolysaccharide of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 68: 239-243.
- ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1981. Cellular glycogen, β -1,2 glucan, poly- β -hydroxybutiric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. Antonie van Leeuwenhoek. 47: 481-847.