

Rev. T. 18/70

T
12
99

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio genético y bioquímico de los
polisacáridos superficiales de *Rhizobium* sp.
GRH2**

Isabel María López Lara

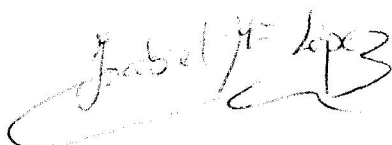
BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	519660844
Nº Copia	21208487

TESIS DOCTORAL

1992

**Estudio genético y bioquímico de los polisacáridos
superficiales de *Rhizobium* sp. GRH2.**

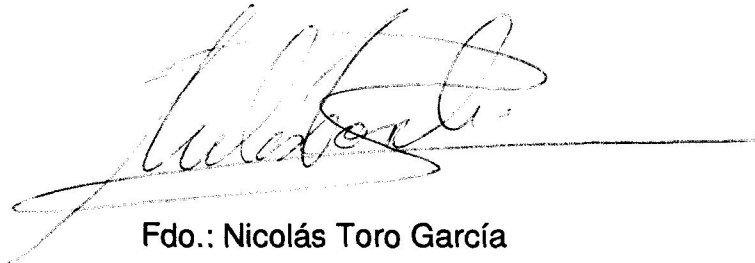
Memoria que presenta la licenciada en Ciencias
Biológicas Doña Isabel María López Lara, para
aspirar al grado de Doctor.



Fdo.: Isabel María López Lara

Vº Bº

El director



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

Indice

1. Introducción	1
1.1 La simbiosis <i>Rhizobium</i> leguminosa	1
1.2 Los genes de la nodulación	3
1.3 Los polisacáridos de superficie en <i>Rhizobium</i>	6
1.4 Lipolisacáridos	6
1.4.1 Estructura	6
1.4.2 Genética	10
1.4.3 Fenotipo simbiótico de los mutantes en los LPS	13
1.4.4 Posibles funciones simbióticas	15
1.4.5 Cambios en la estructura del LPS durante la simbiosis	19
1.5 Polisacárido extracelular (EPS)	20
1.5.1 Estructura	20
1.5.2 Genética	22
1.5.3 Mutantes deficientes en el EPS	27
1.5.4 Posibles funciones simbióticas y efectos de la adición de EPS	30
1.6 Beta glucanos	34
1.7 Lectinas	37

2. Material y Métodos	39
2.1 Estirpes bacterianas	39
2.2 Medios de cultivo	39
2.3 Antibióticos	41
2.4 Conservación de cepas bacterianas	41
2.5 Plásmidos	41
2.6 Plantas	41
2.7 Cultivo axénico de plantas	42
2.7.1 Solución nutritiva	42
2.7.2 Esterilización y germinación de las semillas	43
2.8 Inoculación de las plantas	44
2.9 Reaislamiento de <i>Rhizobium</i> de los nódulos	44
2.10 Cruces entre <i>E. coli</i> y <i>Rhizobium</i>	45
2.10.1 Cruces triparentales	45
2.10.2 Cruces simples	45
2.11 preparación de células competentes de <i>E. coli</i> y transformación	46
2.12 Aislamiento de ADN total de <i>Rhizobium</i>	47
2.13 Obtención de ADN plasmídico	48
2.14 Determinación de la concentración de ADN	49
2.15 Restricción de ADN	50
2.16 Separación e identificación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	50
2.17 Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	51

2.18 Ligación de fragmentos de restricción con extremos cohesivos	52
2.19 Separación e identificación de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa	53
2.20 Transferencia de ADN a filtros de nylon	54
2.21 Preparación de sondas de ADN para hibridación	55
2.21.1 Marcaje radioactivo	55
2.21.2 Marcaje no radioactivo	55
2.22 Hibridación ADN-ADN	56
2.22.1 Hibridación en colonias	56
2.22.2 Hibridación con sonda no radioactiva	57
2.23 Secuenciación de ADN	58
2.24 Construcción del banco de genes de <i>Rhizobium</i> sp. GRH2	59
2.24.1 Vector	59
2.24.2 Preparación del ADN de GRH2 digerido parcialmente en fragmentos <i>Eco</i> RI de aproximadamente 20 kb	60
2.24.3 Ligación y transducción	61
2.25 Medida de la concentración de hexosas	62
2.26 Extracción de EPSs	63
2.26.1 A partir de cultivo en medio líquido	63
2.26.2 A partir de medio sólido	63
2.27 Filtración en Biogel A.5m	64
2.28 Filtración en Sephadex G-25	65
2.29 Fraccionamiento en Sephacryl S-100-HR	65
2.30 Extracción de β (1-2) glucanos	66

2.31 Filtración en Sephadex G-50	66
2.31 Filtración en Sephadex G-25	66
2.32 Cromatografía en DEAE-Sephadex	67
2.33 Producción de los oligosacáridos derivados del EPS	67
2.34 Fraccionamiento de oligosacáridos	67
2.35 Análisis de la composición de los polisacáridos	68
2.36 Métodos espectrométricos	69
2.36.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)	69
2.36.2 Espectrometría de masas con bombardeo atómico rápido (FAB/MS)	69
2.37 Análisis de LPS en geles de poliacrilamida	70
2.37.1 Preparación de las muestras	70
2.37.2 Electroforesis	70
2.37.3 Tinción de plata de los LPS	70
2.38 Ensayos de motilidad	71
2.39 Preparación de membranas internas y síntesis <i>in vitro</i> de β (1-2) glucano	72
2.40 Medida de la actividad UDP glucosa 4'epimerasa	74
2.41 Determinación de Proteínas	76
2.42 Preparación de nódulos para microscopía	76
2.42.1 Fijación	76
2.42.2 Deshidratación	77
2.42.3 Imbibición	77
2.42.4 Inclusión	77
2.42.5 Microtomía y microscopía	77

3 Resultados	78
3.1 Aislamiento de mutantes de <i>Rhizobium</i> sp. GRH2 afectados en polisacáridos de superficie	78
3.2 Localización física del transposón Tn5::mob	78
3.3 Obtención del EPS y fraccionamiento en Biogel A.5m	80
3.4 Análisis del EPS de alto pm en GRH2 y cepas derivadas	82
3.4.1 Composición en monosacáridos	82
3.4.2 Análisis por RMN- ¹ H	83
3.4.3 Despolimerización con PD-I y estructura del EPS	85
3.5 Análisis estructural del EPS de bajo peso molecular	89
3.6 Relación estructural entre NATOOLIGO y EPSOLIGO	94
3.7 Estudio de los LPSs de GRH2 y cepas derivadas	95
3.8 Complementación de los mutantes con el banco de genes de GRH2	95
3.9 Clonación de las inserciones	99
3.10 secuenciación de las inserciones	99
3.11 Análisis de la actividad UDP-glucosa 4'epimerasa	100
3.12 Identificación de ADNs homólogos en otros rizobios	100
3.13 Fenotipo simbiótico	101
3.13.1 Fenotipo simbiótico en plantas de acacia	101
3.13.2 Fenotipo simbiótico en leguminosas herbáceas	101
3.13.3 Efecto del EPS nativo y los oligosacáridos NATOOLIGO y EPSOLIGO en la nodulación de <i>Trifolium</i> y <i>Vicia</i> con la cepa Exo ⁻ GRH2-57	105

3.14 Caracterización de los β (1-2) glucanos asociados a la célula de <i>Rhizobium</i> sp. GRH2	107
3.15 Aislamiento de los genes <i>ndv</i> de <i>Rhizobium</i> sp. GRH2	108
4. Discusión	110
5. Conclusiones	119
Bibliografía	121

1. Introducción.

1.1 La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el dinitrógeno atmosférico en amonio. Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*, inducen en las raíces de las leguminosas la formación de unas estructuras especializadas, los nódulos, dentro de las cuales el dinitrógeno atmosférico es reducido a amonio, este proceso supone el 80% de la fijación biológica de nitrógeno.

La familia *Leguminosae* contiene más de 15.000 especies agrupadas en tres subfamilias, la *Caesalpinioideae*, que es la más antigua y las dos más recientes *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Las leguminosas muestran una amplia diversidad tanto morfológica como de habitats y ecología, encontramos desde formas herbáceas anuales hasta árboles tropicales. La mayoría de las leguminosas son noduladas por los rhizobios, aunque estos últimos son capaces de nodular algunas no leguminosas como *Parasponia*, de la familia *Ulmaceae*. Generalmente los nódulos son formados en las raíces pero a veces se forman también en el tallo, este es el caso de las leguminosas noduladas por *Azorhizobium* del género *Aeschynomene* y *Sesbania*.

La formación de una simbiosis efectiva es un proceso altamente específico, sin embargo, el grado de especificidad varía tremendamente entre los diferentes rhizobios. Así algunas cepas tienen un rango de hospedador muy reducido como p.e. *R. leguminosarum* biovar *trifolii* que sólo fija nitrógeno en especies de *Trifolium* (trébol) o *R. meliloti*, que nodula especies

de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Algunas incluso discriminan entre genotipos como la mayoría de las cepas aisladas de *R. leguminosarum* biovar *viceae* que nodulan la variedad Europea de guisante (*Pisum sativum*) pero no la variedad Afganistan. Otras por el contrario muestran un amplio rango de hospedador, este es el caso de *Rhizobium* sp. NGR234 que nodula 35 diferentes géneros de leguminosas así como la no leguminosa *Parasponia*.

El nódulo es un órgano perfectamente diferenciado que dependiendo de la planta presenta una ontogenia y morfología característica. La formación del nódulo se sucede a través de una serie de etapas, tales como el reconocimiento, la infección a través de los pelos radicales o en ciertos casos, a través de roturas existentes en la epidermis, la estimulación de la división de las células de la planta, la diferenciación de los nódulos, la multiplicación de la bacteria y su conversión en bacteroide. Este conjunto de pasos diferenciados es lo que se ha convenido en llamar características simbióticas de especificidad e infectividad.

La complejidad de este desarrollo que lleva a profundos cambios estructurales y metabólicos en ambos organismos, sugiere la expresión de un gran número de genes tanto del microsimbionte como del hospedador. La planta interviene en el proceso p.e. produciendo una serie de proteínas específicas del nódulo, las nodulinas, algunas de las cuales se han identificado, siendo las más conocidas las leghemoglobinas. En la bacteria se han identificado muchos genes por su función simbióticas o por sus productos derivados. Así se han aislados mutantes afectados en genes que controlan el proceso de infección (genes *nod*, *exo*, *ndv*, *lps*) o genes implicados en las etapas más tardías y/o necesarios para el proceso de fijación de nitrógeno (genes *nif*, *fix*, *dct*). Muchos de estos genes se

encuentran en plásmidos de alto peso molecular y que se conocen como pSym o plásmidos simbióticos. A estos genes, que se pueden considerar como esenciales para la formación de una simbiosis efectiva, hay que añadir otros que aunque no son imprescindibles hacen que dicha simbiosis sea más eficiente. Entre estos genes hay que citar a los *hup* (hidrogenasas) o los genes *nfe* (competitividad), que aumentan la eficiencia del proceso al proporcionar respectivamente la capacidad de reciclar el hidrógeno o aumentar la infectividad y competitividad de la bacteria (Evans *et al.*, 1984; Sanjuan y Olivares, 1987).

El desarrollo de los estudios genéticos y bioquímicos en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, ha permitido avanzar en el conocimiento de los genes de la nodulación y los polisacáridos superficiales, dos componentes fundamentales de la bacteria necesarios en el proceso de infección de las leguminosas.

1.2 Los genes de la nodulación.

Los estudios de genética molecular han llevado a la identificación de un número de genes necesarios para el proceso de nodulación, y que se conocen como genes *nod* y *nol*.

Los genes de la nodulación están organizados en operones de una forma muy similar tanto en *Rhizobium* como en *Bradyrhizobium* spp. (Schlaman *et al.*, 1992; Denarié y Roche, 1992; Kondorosi, 1992). En las especies de rápido crecimiento de *Rhizobium* los genes *nod* se encuentran localizados en plásmidos mientras que en *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* se localizan en el cromosoma. Inicialmente los genes *nod* fueron clasificados en genes *nod*-comunes (intercambiables entre distintas especies) y genes *nod*-específicos (*hsn*). Hoy en día esta diferenciación no es tan estricta. Los genes

nod-comunes comprenden *nodA*, *-B*, *-C*, *-I*, y *-J*, forman un operón siendo esenciales para la nodulación *nodA*, *-B* y *-C*. Otro gen esencial es el gen *nodD* del que puede haber varias copias dependiendo de la especie de rizobio. El gen *nodD* se comporta como común en algunas plantas huésped, mientras en otros casos determina especificidad de hospedador. Algunos genes *hsn* son comunes en todas las especies de *Rhizobium*., *nodFE*, *nodL*, y *nodM*. Otros, sin embargo, están presentes en solo algunas especies o biovariedades, es el caso de *nodO* en *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *nodH* y *nodPQ* en *R. meliloti*, y *nodZ* en *B. japonicum*. Existen otros genes *nod* y otros designados *nol* que también tienen algún papel en la nodulación y que se han descrito más recientemente, aunque el papel de muchos de ellos todavía no se ha aclarado. Un esquema de la organización de los genes de la nodulación se muestra en la Figura 1A.

Hoy se sabe que la mayoría de estos genes están implicados en la síntesis de compuestos señales extracelulares cuya estructura en general es un tetra- o pentámero de N-acetilglucosaminas con diferentes sustituciones (Fig. 1B). Los genes *nod* comunes estarían implicados en la síntesis y tal vez en la secreción de la estructura carbonada mientras los genes *hsn* intervendrían en la adición de sustituciones a la molécula fundamental (Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1991).

La producción de estas moléculas señales está sometida a un estricto control que es ejercido a través del producto del gen *nodD*. NodD es un activador transcripcional que se une a secuencias específicas presentes en los promotores del resto de genes *nod* y *nol*, conocido como *nod*-box. La activación ocurre gracias a la interacción de NodD con flavonas, flavononas e isoflavonas presentes en los exudados de las leguminosas (Schlaman *et al.*, 1992).

Hoy en día se sabe que los factores de la nodulación o lipooligosacáridos, nombre por el que también se conocen a estas moléculas señales sintetizadas por la bacteria inducen la deformación y curvatura de los pelos radicales así como el desarrollo del meristemo nodular, al mismo tiempo que llegan a inducir algunas de las nodulinas tempranas del proceso simbiótico (Dénarié y Roche, 1992).

1.3 Los polisacáridos de superficie en *Rhizobium*.

Las células bacterianas a menudo están rodeadas por cápsulas y/o capas mucosas, principalmente compuestas por polisacáridos ácidos y neutros (a veces por polipéptidos ácidos). Interno a estas capas están las superficies más externas permanentes en las bacterias, la gruesa pared de peptidoglicano en las eubacterias gram-positivas o la membrana externa en las eubacterias gram- negativas. Esta última tiene una bicapa lipídica cuya mitad externa está compuesta principalmente de abundantes lipopolisacáridos (LPSs). En diferentes ocasiones se ha puesto de manifiesto que los polisacáridos son una clase importante de moléculas implicadas en interacciones moleculares y celulares. Así, los polisacáridos de superficie aparentemente son cruciales en muchas relaciones patogénicas y de comensalismo de las bacterias con animales (Costerton y Irvin, 1981; Nikaido y Vaara, 1985) y plantas (Coplín y Cook, 1990). Las moléculas de oligosacáridos derivados de paredes celulares de hongos y plantas se han identificado como señales reguladoras que afectan la expresión de ciertos genes de la planta (Albersheim y Darvill, 1985; Ryan, 1988). En la simbiosis mutualista *Rhizobium*-leguminosa, los polisacáridos de superficie juegan un papel importante en el desarrollo del proceso simbiótico (Noel, 1992). Estos polisacáridos se clasifican en tres tipos generales: lipopolisacáridos (LPSs), polisacáridos extracelulares (EPSs) y glucanos cíclicos.

1.4 Lipopolisacáridos.

1.4.1 Estructura.

Los lipopolisacáridos (LPSs) en *Rhizobium*, así como los más estudiados de las enterobacterias, están formados por una porción

polisacarídica y una porción lipídica (lípidio A). La fracción polisacarídica comprende un núcleo oligosacarídico y una molécula de gran peso molecular llamada cadena específica O o antígeno O, que confiere propiedades antigénicas específicas de la cepa. El lípidio A consiste en un oligosacárido (generalmente un disacárido) al que se unen ácidos grasos. El lípidio A es la parte hidrofóbica de la molécula, que ancla la estructura completa del LPS en la membrana externa, embebiéndose en su mitad externa. Al lípidio A se le une covalentemente el núcleo oligosacarídico que consiste en un pequeño número de azúcares, unido al núcleo está la región polimórfica del LPS (antígeno O) que se proyecta hacia el exterior desde la superficie celular. La porción polisacarídica se une al lípidio A a través de un azúcar de ocho carbonos llamado ácido 2-ceto-3 desoxioctánico (Kdo).

Una preparación típica de LPSs de rizobios, o de otras bacterias gram negativas, contiene una mezcla de LPSs completos e incompletos. Las formas completas contienen lípidio A, núcleo y antígeno O, mientras que a las incompletas les falta el antígeno O. Una técnica adecuada para analizar el contenido de LPS en una determinada cepa son los geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), seguida de tinción con nitrato de plata (Hitchcock y Brown, 1983). Cuando los LPSs de *R. leguminosarum* son sometidos a esta técnica, aparecen separados en dos formas. Las bandas que migran más lentamente (LPS I) son formas completas del LPS, mientras que las que migran más rápidamente (LPS II) se tratan de formas incompletas (Carlson *et al.*, 1987). Los componentes individuales de los LPSs son aislados por hidrólisis ácida suave, que rompe las uniones entre el Kdo y el lípidio A, seguida por filtración en gel de la parte soluble polisacarídica. Aunque se ha estudiado la composición de los LPSs en *R. meliloti*, *B. japonicum*, y *S. fredii*, la especie de rizobio en la que mejor se conoce la estructura completa del

LPS es en *R. leguminosarum* (Carlson *et al.*, 1989). Dicha estructura se representa en la Figura 2.

El antígeno O es muy complejo y variable entre las distintas cepas de rizobios. En *R. leguminosarum* los componentes pueden ser numerosos residuos glicosídicos metilados, glucosaminas metiladas, 6 deoxiglucosaminas, heptosas, ácido urónico y Kdo (Carlson *et al.*, 1991). El residuo de Kdo se encuentra en el extremo reductor de todas las cepas de *R. leguminosarum* estudiados. Se ha puesto de manifiesto que cepas de *R. leguminosarum* que nodulan la misma planta pueden tener antígenos O muy diferentes (Carlson, 1984; Carlson *et al.*, 1978) El antígeno O, en las pocas cepas de *B. japonicum* en los que se ha estudiado, varía en sus componentes glicosídicos. Como azúcares típicos de estos antígenos se incluyen fucosa, fucosamina, glucosa y quinovosamina (Carrion *et al.*, 1990; Puvanesarajah *et al.*, 1987). Por otra parte, las especies de *R. meliloti* y *S. fredii* no presentan cadenas largas de antígeno O, que contiene principalmente ácido urónico, glucosa y glucosamina en el primer caso y ácido urónico, glucosa y galactosa en el segundo, si bien los LPSs de ambas especies contienen cantidades relativamente grandes de Kdo, resultado de tener un antígeno O pequeño (Carlson *et al.*, 1991). Sin embargo, se ha descrito posteriormente que tanto en *R. meliloti*, como en *S. fredii*, el alto contenido en Kdo no se debe al LPS sino a otro polisacárido de superficie con alto contenido en Kdo que es estructuralmente homólogo a los antígenos K del grupo II descritos en *E. coli* (Reuhs *et al.*, 1992a y b).

El núcleo del LPS de *R. leguminosarum* difiere bastante del núcleo del LPS de las enterobacterias. No hay residuos de heptosa, y por hidrólisis ácida suave se liberan dos oligosacáridos, un trisacárido y un tetrasacárido, compuestos por galactosa, manosa, Kdo y ácido galacturónico (Carlson *et al.*,

1989). Esta estructura, mostrada en la Figura 2, es idéntica para todas las cepas de *R. leguminosarum* estudiadas (Carlson *et al.*, 1991). En *B. japonicum* el núcleo contiene 4-o-metilmanosa, glucosa y Kdo, y los resultados presentes indican que la estructura del núcleo del LPS en distintos serogrupos de *B. japonicum* es común (Carrion *et al.*, 1990). La estructura y composición del núcleo en *R. meliloti* y *S. fredii* están bajo estudio, pero en ambos casos es muy similar y entran a formar parte de su composición Kdo y galactosa (Carlson *et al.*, 1991).

Como se ha dicho anteriormente, el lípido A consiste en un esqueleto glucosídico (disacárido) al que se unen ácidos grasos. Entre los rizobios se conocen tres tipos de componentes glicosídicos del lípido A: glucosamina (*R. meliloti* y *S. fredii*), un disacárido de glucosamina-ácido galacturónico (*R. leguminosarum*) y 2,3-diamino-2,3-dideoxiglucosa sola o en combinación con glucosamina (Bhat *et al.*, 1991). Los ácidos grasos mayoritarios del lípido A son el ácido 27-hidroxi octacosanoico, descubierto por Hollingsworth y Carlson en 1989, y ácidos grasos 3 hidroxilados típicos del lípido A de las enterobacterias.

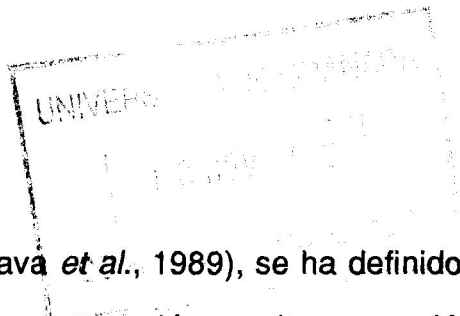
Bhat *et al.* en 1991, basándose en estudios de la composición y estructura de los núcleos oligosacáridicos y los lípidos A de los rizobios, han establecido tres grupos de LPSs: tipo I incluye todas las cepas de *R. leguminosarum* biovar *viceae*, *phaseoli* y *trifolii*.; el tipo II incluye todas las cepas de *B. japonicum* y el tipo III las cepas de *R. meliloti* y *S. fredii*.

El descubrimiento del ácido graso de larga cadena, 27-hidroxi octacosanoico en los LPSs de *Rhizobium* (Hollingsworth y Carlson, 1989), ha llevado a un estudio sobre la presencia de este ácido graso en diferentes LPSs. Todos los miembros de la familia *Rhizobiaceae* contienen este ácido graso en sus LPSs, excepto *Azorhizobium caulinodans* (Bhat *et al.*,

1991). La presencia de este ácido graso parece ser una consecuencia de la filogenia pues todas las bacterias que contienen ácido 27-hidroxi octacosanoico pertenece al subgrupo de Proteobacteria (Bhat *et al.*, 1991). La función de esta larga cadena de ácido graso es desconocida. Carlson *et al.* (1991) postulan que dada su longitud tiene la posibilidad de extenderse en toda la bicapa de la membrana externa. La localización del grupo hidroxilo en el penúltimo carbono debe ser esencial para interacciones con componentes de la parte interna de la membrana externa, tales como proteínas y fosfolípidos. Esta interacción puede contribuir a incrementar la estabilidad y rigidez de la membrana externa de estas bacterias. Quizás este aumento en la estabilidad de la membrana externa es esencial para la supervivencia de estas bacterias en un ambiente natural, pero hostil, por ejemplo manteniéndose viables mientras están dentro de las células de su hospedador (Carlson *et al.*, 1991).

1.4.2 Genética.

Los primeros estudios sistemáticos sobre la genética de los LPSs se desarrollaron a partir del descubrimiento de que una serie de mutantes Ndv⁻ (afectados en el desarrollo del nódulo) de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFN42, obtenidos por mutagénesis al azar, estaban afectados en la región polisacáridica del LPS (Noel *et al.*, 1986). Finalmente, se ha mostrado que mutaciones que afectan a los LPSs están localizadas en cinco regiones genéticas, definidas por clonación de ADN de la cepa CFN42 (Cava *et al.*, 1998; Diebold y Noel, 1989). Una de estas regiones está localizada en un plásmido nativo distinto al plásmido simbiótico en la cepa CFN42, al igual que ocurre en 6 de 10 cepas examinadas de *R. leguminosarum* (Hynes *et al.*, 1990). En esta región, que en el caso de la cepa CFN42 está clonada en el



plásmido recombinante pCOS126 (Cava *et al.*, 1989), se ha definido un solo locus, llamado *lpsb*. Las mutaciones en esta región resultan en moléculas de LPS que tienen un núcleo truncado y carecen del antígeno O (Brink *et al.*, 1990). Parece que esta región especifica una función que está conservada entre las cepas de *R. leguminosarum*, posiblemente una enzima implicada en la síntesis de la porción conservada (núcleo) del LPS (Brink *et al.*, 1990).

En una región *lps* mucho más extensa localizada en el cromosoma de la cepa CFN42, se han identificado, por análisis de complementación, nueve unidades transcripcionales. Esta región se encuentra clonada en el plásmido recombinante pCOS109.11 y los loci han sido designados *lpsABCDEFGHI*. Las mutaciones en esta región resultan en cambios en el antígeno O con un núcleo inalterado (Cava *et al.*, 1989), o alteraciones en el núcleo acompañadas de la pérdida del antígeno O (Carlson *et al.*, 1989). Al menos algunos de los genes clonados en pCOS109.11 codifican funciones específicas requeridas para la síntesis del antígeno O de la cepa CFN42 (Brink *et al.*, 1990). Esta conclusión se apoya en el hecho de que un mutante de la cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 al ser complementado con pCOS109.11 produce el LPS de la cepa CFN42. Además, cuando este cósmido es introducido en las estirpes salvajes *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 y *R. leguminosarum* bv. *viceae* 128c53, se produce un LPS I adicional que es similar al de CFN42. Aparte de genes específicos para la síntesis del antígeno O, el cósmido pCOS109.11 debe llevar algunos genes que son necesarios para la síntesis del núcleo. Otro gen (*lpsg*) localizado en otra parte del cromosoma de CFN42, clonado en el plásmido recombinante pCOS309 (Cava *et al.*, 1989), es importante para la síntesis del núcleo. Las mutaciones en una cuarta región presentan menos cantidad de moléculas LPS I de lo normal (Cava *et al.*, 1989).

La quinta región identificada en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 está implicada en la síntesis de la estructura del LPS y EPS (Diebold y Noel, 1989). Esta región se encuentra en el cromosoma y ligada a la región que codifica para la síntesis de EPS. Las dos mutaciones Tn5 analizadas en esta región de CFN42 hacen que esta cepa no produzca EPS ni el antígeno O del LPS. Sin embargo, al transferir estas mismas mutaciones a *R. leguminosarum* bv. *viciae* 128c569, afecta a la producción de EPS pero el LPS no es modificado (Diebold y Noel, 1989).

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 se ha identificado y clonado una región cromosómica necesaria para la síntesis del LPS (Priefer, 1989). Por análisis de complementación se ha definido una región de aproximadamente 15 kb contenida en el cósmido pCos4 (tiene clonadas 37 kb de ADN de la cepa VF39) en la que hay al menos cinco unidades transcripcionales distintas. Las mutaciones en esta región dan lugar a cepas que carecen del polisacárido O (Priefer, 1989). Los resultados de secuenciación de esta región muestran que algunos de los productos de los genes muestran homología con proteínas que se conoce que están implicadas en otras bacterias gram-negativas en la síntesis y excreción de polisacáridos (Priefer *et al.*, 1992). Esta región podría corresponderse con la extensa región cromosómica *lps* de CFN42 (Noel, 1992).

En *R. meliloti* se han identificado varios genes implicados en la síntesis de LPS y resistencia a bacteriófagos. Así, en la cepa SU47 se definieron dos loci, *lpsB* y *lpsC*, que mapean en el cromosoma (Clover *et al.*, 1989). Posteriormente, Williams *et al.*, (1990b) clonaron a partir de *R. meliloti* Rm41 el gen *lpsZ*⁺, localizado en el segundo megaplásmido (pEXORm41) de esta cepa, pero que no se encuentra en la cepa SU47. El gen *lpsZ*⁺ activo suprime el defecto simbiótico de mutantes *exoB* de *R. meliloti* mediante la

producción de un LPS alterado. A este fenotipo se le ha llamado Sxb⁺: supresor de *exoB*. Se han aislado mutaciones en dos nuevos loci cromosómicos y ligados entre si, *lpsX* y *lpsY*, que están implicados en la supresión Sxb. Al igual que *lpsZ*⁺, *lpsX*⁺ y *lpsY*⁺ alteran el LPS, aunque a diferencia de *lpsZ*⁺, ambos están presentes en la cepa SU47 (Williams *et al.*, 1990a). También en *R. meliloti* SU47 se ha delimitado por mutagénesis directa con Tn5 una región cromosómica llamada *fix-23* a la que se han asignado cuatro unidades de complementación. Los estudios de los mutantes en esta región indican que estos genes están implicados en la síntesis de un LPS específico de la cepa (Putnoky *et al.*, 1990). Sin embargo, recientemente se ha descrito que esta región está implicada en la síntesis de un polisacárido de superficie con alto contenido en Kdo que no está relacionado con los LPSs y muestra una gran similitud con antígenos K del grupo II descritos en *E.coli* (Reuhs *et al.*, 1992b). En ningún caso se han definido los efectos estructurales producidos en mutaciones en los genes *lps* de *R. meliloti*.

En *A. caulinodans* se ha descrito y aislado un locus implicado en la síntesis de los LPSs. La secuencia de este locus muestra homología con el locus *rbf* de *Salmonella typhimurium*, implicado en la síntesis del antígeno O (Goethals *et al.*, 1992).

Se han descrito mutantes afectados en la estructura de los LPSs en otras especies de rizobios, pero los genes mutados no han sido mapeados o clonados.

1.4.3. Fenotipo simbiótico de los mutantes en los LPS

Los estudios genéticos han mostrado que el LPS es requerido para una nodulación normal y fijación de nitrógeno en algunas combinaciones

rizobio y leguminosa huésped. Los mutantes de *R. leguminosarum* sin LPS I (moléculas que contienen el antígeno O) generalmente son defectivos en el proceso de infección y presentan un fenotipo Ndv⁻. Así, los mutantes derivados de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 forman en las plantas de judía nódulos en los cuales los canales de infección están extrañamente hinchados y abortan, principalmente dentro de las células del pelo radical infectado (Noel *et al.*, 1986). Estos nódulos presentan una actividad meristemática normal durante los primeros días, pero no continúan la diferenciación, permanecen pequeños, blancos y sin hemoglobina (Noel *et al.*, 1986). Aunque la existencia de una actividad meristemática significa que los genes *nod* son funcionales, los nódulos se forman con menos eficiencia, porque aparecen más espaciados en la raíz de lo normal (Noel *et al.*, 1986).

Los mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viceae* y bv. *trifolii* a los que les falta el antígeno O forman nódulos que permanecen pequeños y blancos. Los estudios microscópicos de estos nódulos muestran que los mutantes LPS I son capaces de infectar suficientemente para ser depositados en pequeño número dentro de algunas células del nódulo. El desarrollo del nódulo no es completo y no se detecta actividad nitrogenasa, o es apenas detectable (Brink *et al.*, 1990; deMaagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989). Sin embargo, mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viceae* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que tienen un polisacárido O alterado son capaces de nodular normalmente su hospedador correspondiente (Brink *et al.*, 1989; deMaagd *et al.*, 1989).

Clover *et al.* (1989), han descrito que mutantes en los LPS de *R. meliloti* no son defectivos en la simbiosis, pero en este caso no se conoce cómo están afectados los LPS. De cualquier modo, si el LPS de *R. meliloti* tiene un papel en la simbiosis, éste debe tolerar una gran variedad de alteraciones en el LPS.

Los mutantes en el LPS de *B.japonicum* son también simbióticamente defectivos. Así, un mutante derivado de *B.japonicum* 61A76 que carece de ciertos azúcares en el LPS no forma nódulos en soja. Otro mutante derivado de *B.japonicum* 110 al que le falta el antígeno O no produce nodulación visible (Puvanesarajah *et al.*, 1987). En *A.caulinodans* mutantes en el LPS tienen un fenotipo Nod⁻ en *Sesbania rostrata* (Goethals *et al.*, 1992)

Dado que la existencia de LPS truncados en las enterobacterias conlleva una serie de cambios pleiotrópicos en la membrana externa (Nikaido y Vaara, 1985), se ha investigado esta posibilidad en los mutantes LPS de *R. leguminosarum*. Sin embargo, no hay diferencias consistentes en cuanto al contenido proteico en la membrana externa, ni tampoco se pudo detectar liberación de proteínas de la membrana externa en el medio, incluso en mutantes que carecen del polisacárido O y de uno de los oligosacáridos (Noel *et al.*, 1986). El único cambio asociado a estos mutantes *ex planta* es que las células se aglutinan en cultivo líquido y en placas de agar blando. Esta última observación ha sido interpretada como indicativo de una deficiencia en la motilidad (deMaagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989). Sin embargo, observaciones microscópicas de este tipo de mutantes derivados de *R. leguminosarum* CFN42 indican que son mótiles. Usando un mutante en el que los genes *lps* han sido deleccionados, ha sido posible aislar un mutante sin LPS I pero que no aglutina en medio líquido o en placas de agar blando. Sin embargo, este mutante doble todavía presenta fenotipo Ndv⁻, indicando que esta aglutinación o "motilidad" no es la causa del defecto simbiótico (Noel, 1992).

1.4.4. Posibles funciones simbióticas.

Se han dado variadas respuestas a porqué es necesario un LPS completo. Una posibilidad es que sirva como compuesto señal que dispare ciertos mecanismos importantes para la infección por *Rhizobium*. En este papel, los LPS han sido considerados tradicionalmente como receptores fijados a la membrana externa, pero también podría servir como una señal difusible. La liberación de LPS y de fragmentos de la membrana externa de las bacterias es común (Mayrand y Grenier, 1989), y se encuentran moléculas de LPS I en los sobrenadantes de cultivos de *R. leguminosarum* (Carlson y Lee, 1990; Diebold y Noel, 1989). El fenotipo de un mutante LPS de *R. leguminosarum* CFN42 parece confirmar este posible papel. Este mutante tiene LPS I con la misma estructura que el de la cepa salvaje, pero la concentración es aproximadamente un tercio de lo normal (Cava *et al.*, 1989). Este mutante es tan deficiente en la infección como los mutantes a los que les falta completamente el LPS I. Si el núcleo oligosacárido y el polisacárido O de este mutante tienen la estructura normal, esto implica que una cantidad normal de LPS es crítica. Esto no sería requerido si el LPS sirve únicamente como un receptor fijado a la membrana (Noel, 1992).

Otras observaciones sugieren que hay una gran variedad de estructuras en las cadenas O que son simbióticamente efectivas, lo cual lleva a ciertas restricciones de cómo el LPS I puede servir como una señal. Mientras la estructura de los núcleos oligosacáridos del LPS están conservadas entre los distintos biovariedades de *R. leguminosarum* (Carlson *et al.*, 1989), los polisacáridos O varían tanto dentro de una misma biovariedad como entre las distintas biovariedades (Carlson, 1984). Por manipulación genética ha sido posible eliminar el LPS I de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 y reemplazarlo por un LPS I cuya composición es prácticamente idéntica al de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 (Brink *et*

al., 1990). La cepa resultante tiene el rango de hospedador de la cepa ANU843, es Fix⁺, y nodula tan bien como la cepa ANU843. Por tanto, aunque el polisacárido O debe estar presente, su estructura específica debe ser irrelevante. Sin embargo, aunque las moléculas de LPS I de ANU843 y CFN42 no son inmunológicamente reactivas entre si, es concebible que compartan alguna estructura característica que es crítica independientemente del hospedador. Otra alternativa es que la estructura que actúa como señal sea el núcleo o el lípido A y que el papel del polisacárido O sea meramente permitir la difusión acuosa (Noel, 1992).

Otras funciones que se han propuesto están basadas en la noción de que la membrana externa de la bacteria está envuelta en una capa prácticamente continua de polisacáridos O. Esta capa podría actuar como un escudo hidrofílico que previene el acceso de moléculas tóxicas hidrofóbicas que de otro modo podrían difundir dentro o a través de la membrana externa. Los antígenos O de los patógenos animales son considerados a menudo escudos que protegen frente a toxinas hidrofóbicas y fagocitosis (Nikaido y Vaara, 1985). Los polisacáridos O de los rizobios aparentemente comparten esta hidrofilia, como se muestra por el incremento de hidrofobicidad de los mutantes LPS⁻ de *R. leguminosarum* (deMaagd *et al.*, 1989). Sin embargo, si el papel es meramente maximizar el carácter hidrofílico de la superficie es extraño que tantos residuos de los polisacáridos O sean deoxiazúcares-O-metilados (Carlson, 1984; Carlson *et al.*, 1987). Otro papel protector podría ser enmascarar a los precursores de las respuestas de defensa del hospedador o de otro modo apoderarse de la respuesta de defensa en cascada del hospedador (Djordjevic *et al.*, 1987a). Un tipo de papel relacionado con los anteriores es proveer una superficie bacteriana apropiada para la endocitosis y otras posibles interacciones entre superficies

durante la infección (deMaagd *et al.*, 1989), por analogía con la acción de los LPS durante la invasión celular de ciertas bacterias endoparásitas. Esta función podría requerir solamente ciertas cualidades de "hidrofilia" o de "carga" (deMaagd *et al.*, 1989), o podría requerir ciertas estructuras específicas (Noel, 1992).

En los hospedadores indeterminados de *R. leguminosarum*, la infección por parte de los mutantes LPS avanza más allá que la infección por este tipo de mutantes en soja y judía. Esto puede indicar que el LPS tiene al menos dos funciones distintas y solamente la segunda es necesaria en los hospedadores indeterminados. En relación con el fenotipo que presentan estos últimos hospedadores, el segundo papel puede ser proveer una superficie bacteriana compatible para la interacción con las membranas de la planta en el momento de la endocitosis o proliferación de bacteroides. El primer papel sería no muy específico y que puede ser llevado a cabo por el LPS o por el EPS, pero que es adoptado por el LPS en los hospedadores determinados porque (posiblemente) la síntesis del EPS es reprimida (Noel, 1992).

Los intentos de restaurar la infección en mutantes LPS⁻ de *R. leguminosarum* CFN42 añadiendo LPS de tipo salvaje no han funcionado, sin embargo, el LPS quizás no ha sido aislado de las células en el estado fisiológico apropiado (Noel, 1992). Se ha publicado que la incubación previa de raíces de trébol con bajas concentraciones de LPS de *R. leguminosarum*, aumenta la frecuencia de canales de infección. Este incremento está restringido a LPS aislado de bacterias en un estado específico de crecimiento, fase estacionaria temprana (Dazzo y Hollingsworth, 1984; Dazzo *et al.*, 1991). Además, Dazzo *et al.* (1991) han demostrado que el LPS purificado de *R. leguminosarum* 0403 se une rápidamente a las puntas de los

pelos radicales y se infiltra a través de la pared del pelo radical, indicando que la interacción LPS-pelo radical contribuye en el complejo proceso de señales que ocurre durante la infección (Dazzo *et al.*, 1991)

1.4.5 Cambios en la estructura del LPS durante la simbiosis.

Las bacterias patógenas de animales muestran muy a menudo cambios en la superficie durante la interacción, probablemente en respuesta a los cambios ambientales y para luchar con el sistema inmune del animal (DiRita y Mekalanos, 1989). Usando anticuerpos monoclonales frente a bacteroides de *R. leguminosarum* bv. *viceae*, se ha demostrado que ocurren cambios en los epitopos de LPS durante la diferenciación de bacteria a bacteroide (Brewin *et al.*, 1986; Sindhu *et al.*, 1990; VandenBosch *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1989). Algunos de estos cambios pueden ser reproducidos fuera de la planta creciendo la bacteria a bajo pH, a baja tensión de oxígeno o por el uso de succinato en lugar de glucosa como fuente de carbono (Kannenberg y Brewin, 1989; Sindhu *et al.*, 1990), condiciones que en parte imitan el microambiente del nódulo. Se han obtenido resultados similares para otra cepa de *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Goosen-de Roo *et al.*, 1991) y para *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Tao *et al.*, 1992). Así mismo se ha descrito para esta última cepa que los cambios en los epitopos se producen también al cultivar a alta temperatura o a baja concentración de fosfato y que para la expresión de dichos cambios *ex planta* no es necesario el plásmido pSym (Tao *et al.*, 1992). También, se han observado ligeros cambios en el LPS de la biovariedad *phaseoli* inducidos por exudados de judía (Noel y Tao, 1992). Estos cambios en los epitopos sólo ocurren en la molécula completa de LPS con cadenas O intactas. Se han aislado mutantes que no son capaces de experimentar estos cambios en los epitopos (Brewin *et al.*, 1990).

Algunos de estos mutantes son defectivos ya que producen nódulos Fix⁻ (Brewin *et al.*, 1990). Bhat y Carlson (1992) han mostrado que al menos se inducen dos cambios químicos en el polisacárido O en el crecimiento a bajo pH y en el estado de bacteroide. Parece ser que pequeños cambios en la molécula de LPS deben ser esenciales para la diferenciación de bacteria a bacteroides fijadores de nitrógeno (Carlson *et al.*, 1991).

1.5 Polisacárido extracelular (EPS).

1.5.1 Estructura.

Las estirpes salvajes de rizobios suelen producir grandes cantidades de exopolisacáridos (EPSs) y forman colonias muy mucosas en los medios de laboratorio. Los EPSs ácidos son polímeros complejos, heteropolisacarídicos de alto peso molecular de unidades repetitivas de 7, 8 ó 9 residuos de azúcares. Estas unidades oligosacarídicas repetitivas contienen azúcares (normalmente hexosas) unidos por varios enlaces alfa y beta en orden lineal o con cadenas laterales. A menudo los azúcares contienen sustituciones no glucosídicas de succinato, piruvato y acetato. La naturaleza ácida viene de los ácidos urónicos y de los sustituyentes no glucosídicos. Aunque las distintas especies de rizobios producen distintas estructuras de EPS, cada especie suele sintetizar sólo una de las formas. Por esto, se ha propuesto que estas estructuras pueden tener un papel en la interacción específica del rizobio con la planta. (Dudman, 1984).

Se ha elucidado la estructura de varios EPSs. En la Figura 3 se muestran las unidades repetitivas de los EPSs mejor conocidos. La mayoría de las cepas de *R. meliloti* producen EPS de unidades octasacarídicas que contienen glucosa y galactosa en proporciones 7:1, lleva una sustitución

piruvato por cada unidad repetitiva, y además lleva sustituciones de acetato y succinato (Aman *et al.*, 1981). A este EPS se le llama EPS I o succinoglucano. *R. meliloti*, además tiene la posibilidad de sintetizar un EPS que normalmente es críptico, al que se llama EPS II o EPS b. Su unidad repetitiva es un dímero de glucosa y galactosa con sustituciones de acetato y piruvato (Glazebrook y Walker, 1989; Levery *et al.*, 1991).

También se ha descrito la estructura del EPS producido por *Rhizobium* sp. NGR234 (la cepa de rizobio con amplio rango de hospedador que nodula leguminosas tropicales y la no leguminosa *Parasponia*). En este caso la unidad repetitiva es un nonasacárido de glucosa, glucurónico y galactosa en proporción 5:2:2, con una sustitución de acetato y otra de piruvato en el grupo de galactosa terminal (Djodorjevic *et al.*, 1986). Parte de la estructura del EPS de la cepa NGR234 es común a la estructura del EPS I de *R. meliloti* (Zhan *et al.*, 1990)

Los EPS de las tres biovariedades de *R. leguminosarum* están compuestos de unidades octasacarídicas de glucosa, galactosa y ácido glucurónico en proporción 5:1:2, además lleva dos sustituciones de piruvato por cada unidad repetitiva y sustituciones de acetato y 3-hidroxi-butirato (Hollingsworth *et al.*, 1988; McNeil *et al.*, 1986)

La síntesis de las unidades repetitivas de oligosacárido implica la unión a un lípido intermediario y se piensa que ocurre en la superficie de la membrana interna (Sutherland, 1985). El ensamblaje sigue un proceso ordenado, se transfiere un residuo de azúcar desde un UDP-azúcar a el lípido transportador de la membrana, a continuación se añade otro azúcar desde otro residuo de UDP-azúcar, y así hasta que se completa la unidad repetitiva; algunos sustituyentes no glucosídicos deben ser incorporados durante la síntesis de la unidad oligosacáridica (Tolmasky *et al.*, 1982). Los

pasos precisos de cómo ocurre la polimerización del exopolisacárido a partir de las unidades oligosacarídicas unidas al lípido aún no se conoce (Gray y Rolfe, 1990).

1.5.2 Genética.

Los loci requeridos para la síntesis o regulación del EPS han sido definidos por mutación, complementación génica y en unos pocos casos por secuencia de nucleótidos. Los estudios genéticos se han hecho principalmente en tres especies de *Rhizobium*: *R. meliloti*, *Rhizobium* sp. NGR234 y *R. leguminosarum*.

En *R. meliloti* se ha identificado un grupo de 13 genes en el segundo megaplásmido y varios genes de localización cromosómica implicados en la síntesis del EPS I (Leigh *et al.*, 1985; Long *et al.*, 1988). Las mutaciones en los genes de localización plasmídica *exoPMALFOPB* y en el gen cromosómico *exoC* bloquean totalmente la producción de EPS I (Long *et al.*, 1988; Zhan *et al.*, 1990). Las mutaciones en los genes plasmídicos *exoNKJG* y en el cromosómico *exoD* afectan a la cantidad o a alguna cualidad del EPS. En concreto, *exoD* parece modular la cantidad de succinoglucano y su distribución entre las fracciones de alto y de bajo peso molecular (Leigh y Lee, 1988). *exoH*, localizado en el segundo megaplásmido, está implicado en la succinilación del EPS I. Las mutaciones en este gen producen EPS sin sustituciones succinato (Leigh *et al.*, 1987) y no forman la fracción de bajo peso molecular que normalmente forma la cepa salvaje (Leigh y Lee, 1988).

En la síntesis del segundo EPS sintetizado por *R. meliloti*, EPS II o EPS b, intervienen seis genes adicionales del segundo megaplásmido (*expACDEFG*) y otro gen situado en el cromosoma (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan *et al.*, 1989).

Los genes *exoB* y *exoC* son requeridos para la síntesis de ambos EPSs (Zhan *et al.*, 1989). Los mutantes *exoB* presentan además LPS alterado (Leigh y Lee, 1988). Este gen ha sido secuenciado en *R. meliloti* y codifica para UDPglucosa 4'epimerasa (Buendia *et al.*, 1991). *exoB* es funcionalmente homólogo al gen *exoB* de *R. leguminosarum* bv. *viceae*, en donde se ha demostrado que también codifica para esta misma enzima (Canter Cremers *et al.*, 1990). Los mutantes *exoC* de *R. meliloti*, aparte de no producir EPS, tampoco producen b glucanos ni la cadena O del LPS (Leigh y Lee, 1988). Se ha mostrado que *exo C* codifica para fosfoglucomutasa (Uttaro *et al.*, 1990).

En *Rhizobium* sp. NGR234 se ha identificado un conjunto de diez genes *exo* (Chen *et al.*, 1988; Zhan *et al.*, 1990). Mediante estudios cruzados de complementación y experimentos de hibridación entre *R. meliloti* y *Rhizobium* sp. NGR234, se ha demostrado que varios de estos genes son funcionalmente intercambiables y que tienen un origen evolutivo similar. En concreto cinco genes *exo* (*exoFMALP* de *R. meliloti*) deben codificar para glucosil transferasas para los cinco residuos y enlaces consecutivos que son compartidos por los EPSs de estas dos bacterias (Zhan *et al.*, 1990). El gen *exoC* de *Rhizobium* sp. NGR234 es equivalente al gen *exoB* de *R. meliloti*. Además, la organización general de la regiones *exo* es similar en ambas especies (Zhan *et al.*, 1990).

En *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42 se han descrito dos genes contiguos, *exoA1* y *exoA2*, de localización cromosómica implicados en la síntesis del EPS, ligada a ellos existe otra región implicada en la síntesis del EPS y del LPS (Diebold y Noel, 1989). Así mismo, en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002 se han identificado dos locus cromosómicos implicados en la síntesis del EPS: *pss1* y *pss2* (Borthakur *et al.*, 1988). Por otra parte, se ha

descrito un locus implicado en la síntesis de EPS localizado en un plásmido nativo distinto al plásmido simbiótico en una cepa de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Skorupska *et al.*, 1991).

El primer inhibidor de la síntesis de los EPSs caracterizado en detalle fue *psi* de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Borthakur *et al.*, 1985; Borthakur y Johnston, 1987) Se han descubierto genes homólogos a *psi* en varias especies: *psdA* en *Agrobacterium tumefaciens* (Kamoun *et al.*, 1989), *exoX* en *Rhizobium* sp. NGR234 (Gray *et al.*, 1990) y *exoX* en *R. meliloti*. (Zhan y Leigh, 1990). La característica común de estos genes es que cuando son clonados en un plásmido multicopia y transferidos a su respectiva cepa salvaje (Exo⁺) los transconjugantes presentan fenotipo Exo⁻. Sin embargo, los mutantes que llevan inserciones Tn5 dentro de las copias genómicas de *psi*, *exoX* o *psdA* producen niveles normales de EPS. Por tanto, no hay un requerimiento absoluto de estos genes y su total ausencia no lleva a la superproducción de EPS (Gray y Rolfe, 1990).

El análisis de la secuencia de *exoX* de *Rhizobium* sp. NGR234 (Gray *et al.*, 1990), de *exoX* de *R. meliloti* (Reed *et al.*, 1991a) y de *psi* (Borthakur *et al.*, 1987) muestra que se trata de proteínas similares y que hay un dominio hidrofóbico muy conservado entre los productos de estos tres genes (Reed *et al.*, 1991). El fenotipo simbiótico asociado con los mutantes en estos genes no es el mismo. Los mutantes en *psi* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* tienen fenotipo Nod⁺Fix⁻ en judía, mientras que los mutantes *exoX* de *R. meliloti* no se afectan en la simbiosis con alfalfa.

Los efectos inhibidores de *psi* y *exoX* pueden ser contrarrestados por otra clase de genes: *pss2* en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Borthakur *et al.*, 1988), *exoY* en *Rhizobium* sp. NGR234 (Gray *et al.*, 1990), y *exoY* en *R. meliloti* (Zhan y Leigh, 1990). Una propiedad común a estos genes

(*pss2/exoY*) es que la inhibición del EPS causada por efecto multicopia de *psi/exoY* es anulada cuando el número de copia de *pss2/exoY* están a un nivel comparable. Por ejemplo, hay producción normal de EPS en los transconjugantes de *Rhizobium* sp. NGR234 que llevan *exoX* y *exoY* en un mismo plásmido, pero ocurre inhibición del EPS cuando el plásmido sólo lleva *exoX*. Las mutaciones en los genes *pss2* y *exoY* llevan a fenotipos Exo⁻. La secuencia de nucleótidos de *pss2* y *exoY* muestra que son claramente homólogos entre sí. Los genes *psi* y *exoX* no inhiben la transcripción de los genes *pss2* y *exoY*, respectivamente o viceversa (Borthakur *et al.*, 1988; Gray *et al.*, 1990).

El análisis de la secuencia de todos estos genes muestra que codifican para proteínas que tienen regiones hidrofóbicas significativas, lo cual indica que podrían formar un complejo postraducional asociado con la membrana (Borthakur *et al.*, 1988; Gray y Rolfe, 1990). Así mismo, Latchford *et al.*, (1991) han demostrado, mediante la expresión de fusiones transcripcionales de fosfatasa alcalina, que los productos de *psi* y *pss2* están asociados con la superficie de la bacteria.

Se ha propuesto que el producto de *exoX* se une reversiblemente a un complejo catalítico biosintético en el que está implicado al menos el producto del gen *exoY*. (Gray y Rolfe, 1988).

La localización y organización de estos genes es distinta. En *R. meliloti* y en *Rhizobium* sp. NGR234 los genes *exoX* y *exoY* se encuentran ligados, pero mientras en *R. meliloti* están localizados en el segundo megaplásmido, en la cepa NGR234 están en el cromosoma. El gen *psi* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* se encuentra en el plásmido simbiótico cercano a los genes *nod* y *nif*, y *pss2* está en el cromosoma. Ligado a *psi* existe otro gen llamado *psr*, que también es capaz de restaurar el fenotipo mucoso en las estirpes con

multicopia de *psi*. Esto es porque *psr* reprime la transcripción de *psi* (Borthakur y Johnston, 1987).

En *R. meliloti* se han descrito dos loci cromosómicos no ligados implicados en la regulación de la biosíntesis del EPS I, llamados *exoR* y *exoS* (Doherty *et al.*, 1988). Las mutaciones en estos genes causan superproducción de EPS I (Doherty *et al.*, 1988; Reuber *et al.*, 1991). Los mutantes en *exoS* son capaces de nodular normalmente pero los mutantes *exoR* presentan fenotipo Inf⁻. Este resultado muestra que una síntesis desregulada de EPS I es perjudicial para la nodulación y sugiere que una atenuación de la biosíntesis por ExoR es esencial en alguna etapa de la nodulación (Reed *et al.*, 1991b). Se ha demostrado que las mutaciones en *exoR* provocan un incremento de los niveles de ARN mensajero de los genes *exo*. Esto indica que ExoR ejerce un control de la expresión de los genes *exo* a nivel de transcripción. El gen *exoR* ha sido secuenciado pero no se ha encontrado homología con reguladores transcripcionales (Reed *et al.*, 1991b)

También se han descrito genes cromosómicos reguladores de la expresión de EPS II. En *R. meliloti* SU47 se ha descrito *mucR*. Las mutaciones en este gen hacen que se produzca EPS II que normalmente es críptico (Zhan *et al.*, 1989). De forma análoga se ha descrito en *R. meliloti* Rm1021 el gen cromosómico *expR* (Glazebrook y Walker, 1989).

Se ha demostrado en *R. meliloti* una regulación coordinada entre genes *exo* y *nod* a través de la actividad de los genes *syrM*, *syrA* y *nodD3*. El gen *syrM* puede incrementar la expresión de los genes *nod* en conjunción de *nodD3* y puede incrementar la actividad de los genes *exo* en conjunción con *syrA* (Mulligan y Long, 1989). En *S. fredii* el gen *nodD2*, que como los anteriores se encuentra en el plásmido simbiótico, está también implicado el

la regulación de la síntesis del EPS; cuando *nodD2* está presente en multicopia no ocurre la síntesis de EPS (Appelbaum *et al.*, 1988).

1.5.3 Mutantes deficientes en el EPS.

Se ha comprobado que las mutaciones que afectan a la síntesis de los EPSs tienen efectos muy diversos en el proceso de nodulación, obteniéndose fenotipos muy variados en los mutantes deficientes en la síntesis de EPSs.

El succinoglucano (EPS I producido por *R. meliloti*) tiene la propiedad de unirse al colorante fluorescente calcofluor, de forma que las bacterias productoras crecidas en un medio sólido adicionado de calcofluor muestran una fluorescencia brillante cuando son iluminadas con luz ultravioleta. En distintos laboratorios se han obtenido mutantes de *R. meliloti* afectados en la producción de EPS seleccionando para colonias no fluorescentes (Finan *et al.*, 1985, 1986; Leigh *et al.*, 1988; Hynes *et al.*, 1986; Müller *et al.*, 1988) Estos mutantes Exo⁻ inducen nódulos que carecen de canales de infección o con muy poca infección en *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Este fenotipo Ndv⁻ es completamente suprimido en alfalfa (*Medicago*), pero no en otros hospedadores, por la producción de un EPS normalmente críptico (EPS II) (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan *et al.*, 1989). Por tanto, EPS I o EPS II son suficientes para permitir la eficiencia simbiótica de *R. meliloti* en alfalfa. Aparte del carácter ácido, la única característica común a la estructura de EPS I y EPS II es el motivo glucosa-beta(1-3)-galactosa. En ambos casos la glucosa del disacárido debe estar acetilada. La acidez en si misma debe ser una característica clave, ya que mutantes que no tienen las sustituciones succinato son Ndv⁻, a pesar de tener un cantidad normal de EPS (Leigh *et al.*,

1987). En la cepa *R. meliloti* Rm41 parece haber otro componente capaz de sustituir a EPS I o EPS II en el proceso de infección. En esta cepa las mutaciones *exoB* previenen la formación de EPS I y EPS II, pero se forman nódulos normales fijadores de nitrógeno (Putnoky *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990a). Sin embargo, los mutantes *exoB* de *R. meliloti* Rm41 son Ndv⁻, si además tienen mutado uno de los siguientes loci: *lpsX*, *lpsY*, *lpsZ* o *fix-23* (Putnoky *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990a y 1990b). El gen *exoB*⁺ o bien *fix-23*⁺ suprimen completamente el fenotipo Ndv⁻ de los dobles mutantes *exoB fix-23* (Putnoky *et al.*, 1990). Además la transferencia de *lpsZ*⁺ a *R. meliloti* SU47 (que no lleva este gen) convierte a los mutantes *exoB* en estirpes Ndv⁺ Fix⁺ (Williams *et al.*, 1990a). Como se ha mencionado anteriormente, estos genes supresores especifican para una estructura de LPS; mutaciones en *fix-23* claramente afectan a un polímero que contiene Kdo (Putnoky *et al.*, 1990). *lpsZ* y *fix-23* obviamente son distintos genéticamente, puesto que *lpsZ* está localizado en un plásmido nativo, mientras que *fix-23*, *lpsX* y *lpsY* son cromosómicos (Putnoky *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990a y 1990b).

El fenotipo simbiótico de mutantes no mucoides de la cepa de amplio espectro *Rhizobium* sp. NGR234 depende del hospedador. Al menos algunos de estos mutantes son Ndv⁺ Fix⁺ en hospedadores que forman nódulos determinados, pero en *Leucaena leucocephala*, que forma nódulos indeterminados, todos los mutantes no mucoides presentan fenotipo Ndv⁻ similar al de los mutantes Exo⁻ de *R. meliloti* (Chen *et al.*, 1985).

Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* producen EPS ácido cuya estructura es básicamente la misma en la mayoría de las cepas, independientemente del hospedador (biovariedad) (McNeil *et al.*, 1986). Los mutantes no mucoides son deficientes en el EPS (Diebold y Noel, 1989). En la biovariedad *viceae* las cepas Exo⁻ son Nod⁻ en guisante, aparentemente

no se induce tejido nodular (Diebold y Noel, 1989; Borthakur *et al.*, 1986); en la biovariedad *trifolii* los mutantes Exo^- son Ndv^- en trébol (Diebold y Noel, 1989; Chakravorty *et al.*, 1982). Además Diebold y Noel (1989) han mostrado que mutaciones Exo^- de la biovariedad *phaseoli* que llevan a un fenotipo completamente efectivo en la nodulación de judía, al ser introducidas estas mismas mutaciones en las biovariedades *viceae* o *trifolii* forman nódulos defectivos en guisante y trébol respectivamente.

Aunque en *R. meliloti* LPS y EPS pueden sustituirse en las funciones simbióticas, en *R. leguminosarum* no hay evidencias para esta posibilidad. Los mutantes Exo^- de *R. leguminosarum* son simbióticamente defectivos en trébol y guisante, a pesar de tener LPS con estructura normal (Diebold y Noel, 1989) Así mismo, los mutantes LPS I son defectivos en todos los hospedadores independientemente de que produzcan un EPS normal o no. Aunque, si las mutaciones en *lpsBXYZ* y *fix-23* afectan al LPS de *R. meliloti*, es bastante posible que los efectos resultantes no sean comparables a la ausencia de LPS I de *R. leguminosarum* (Noel, 1992).

Los mutantes Exo^- de *Rhizobium loti* son completamente efectivos en *Lotus pedunculatus* (hospedador de nodulación determinada) pero son inefectivos, induciendo la formación de nódulos muy pequeños o estructuras con crecimiento similar a tumores, cuando son inoculados en *Leucaena leucocephala* (Hotter y Scott, 1991)

Se ha mostrado en dos cepas distintas de *S. fredii* que los mutantes Exo^- son Nod^+ Fix^+ en soja (Kim *et al.*, 1989; Ko y Gayda, 1990).

Estas observaciones parecen sugerir que el EPS es requerido para los nódulos indeterminados, pero no es necesario para los determinados (Gray y Rolfe, 1990; Gray *et al.*, 1992; Noel, 1992).

En general aquellos mutantes Exo⁻ de *Rhizobium* que son incapaces de formar nódulos funcionales, pueden ser complementados por un mutante Exo⁺ Nod⁻ de la misma cepa salvaje cuando son coinoculados en el hospedador. Un mutante Nod⁻ de *Rhizobium* sp. NGR234, que ha sido curado de su plásmido simbiótico y consecuentemente no tiene los genes *nod* esenciales, fue coinoculado con un mutante Exo⁻ de *Rhizobium* sp. NGR324 que era capaz de producir encurvamiento en las raíces, pero era incapaz de formar nódulos; juntos pudieron formar nódulos fijadores de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* (Chen y Rolfe, 1987). Se han llevado a cabo experimentos similares de coinoculación entre mutantes Exo⁻ Nod⁺ y Exo⁺Nod⁻ que han resultado en nódulos fijadores en trébol por *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Chakravorty *et al.*, 1982), en guisante por *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Borthakur *et al.*, 1988), y en alfalfa por *R. meliloti* (Klein *et al.*, 1988; Müller *et al.*, 1988). Klein *et al.*, (1988) llevaron a cabo un examen detallado de los ocupantes de los nódulos de alfalfa resultantes de experimentos de coinoculación con cepas defectivas pero complementarias. Sus resultados eran bastante interesantes en el sentido de que los mutantes Exo⁻ Nod⁺ podían conseguir formar nódulos Fix⁺ al ser coinoculados con una cepa Exo⁺ Nod⁻, pero no con una cepa Exo⁺ Nod⁺ Fix⁻ ni incluso con la cepa salvaje. Para una combinación efectiva, uno de los coinoculantes debe llevar el fenotipo Nod⁺ y el otro el fenotipo Exo⁺. Si estas dos funciones las lleva la misma cepa, entonces el participante Exo⁻ queda excluido de la infección, quizás por la incapacidad de competir porque necesita adquirir uno de estos requisitos por complementación intercelular (Klein *et al.*, 1988).

1.5.4 Posibles funciones simbióticas y efectos de la adición de EPS.

Como en el caso de los LPS, una dificultad para definir el papel de los EPS es que la gravedad del bloqueo de la infección depende de cada simbiosis particular: Los mutantes Exo^- pueden ser Nod^- , no infectivos $\text{Inf}^- \text{Ndv}^-$, parcialmente infectivos Ndv^- , o $\text{Nod}^+ \text{Fix}^+$. Luego es posible que el EPS tenga diferentes funciones en diferentes combinaciones microsimbionte-hospedador, y más de una función en un hospedador dado (Noel, 1992).

Las posibles funciones de los exopolisacáridos en la simbiosis son: dar protección frente a las respuestas de defensa de la planta hospedadora; actuar como una señal para la planta, bien sea como molécula de alto peso molecular o como oligosacáridos; reconocimiento de los pelos radicales susceptibles de ser infectados; actuar como transportadores de enzimas extracelulares y formar parte de la matriz del tubo de infección (Leigh *et al.*, 1987; Long *et al.*, 1988a).

Con respecto a evadir o suprimir las respuesta de defensa de la planta, es interesante que las $\beta(1-3)$ glucanasas son las enzimas hidrolíticas mayoritariamente inducidas cuando las plantas son expuestas a patógenos (Kombrink *et al.*, 1988), y que los EPS producidos por *R. meliloti* tienen un solo enlace $\beta(1-3)$ en cada unidad repetitiva, además se sabe que los azúcares que intervienen en esta unión están modificados en el caso de EPS II y probablemente lo estén en el caso de EPS I. Quizás las modificaciones alrededor del enlace $\beta(1-3)$ previene la acción de las $\beta(1-3)$ glucanasas y así protegen la bacteria frente a las respuestas de defensa de la planta (Glazebrook y Walker, 1989). Los EPS también se han implicado en la supresión de las repuestas de defensa de la planta por el hecho de que los EPS de *R. leguminosarum* y *B. japonicum* inhiben la actividad de la enzima $\beta(1-3)$ glucano sintasas de soja y guisante. Esta enzima es responsable de la síntesis de calosa, que se deposita rápidamente en el lugar de degradación

de la pared celular como respuesta de defensa de la planta. Este depósito podría formar una barrera para la invasión e impedir el establecimiento de una simbiosis efectiva (Ahlborn y Werner, 1991)

La especificidad de acción de los EPS indican que deben tener un papel más allá del simple papel pasivo o estructural en la superficie de los rizobios (Gray y Rolfe, 1990). Por ejemplo, el segundo EPS (EPS II o EPSb) de *R. meliloti* es suficiente para la simbiosis con alfalfa, pero no con otras cuatro plantas que normalmente son hospedadores de esta especie (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan *et al.*, 1989). Además, los mutantes *exoH* de *R. meliloti*, producen sólo polímeros de alto peso molecular sin grupos succinato, y son defectivos en la infección y en el crecimiento del canal de infección (Leigh *et al.*, 1987). La falta del grupo succinilo es concomitante con la ausencia de EPS de bajo peso molecular (Leigh y Lee, 1988), lo que sugiere que el grupo succinato es importante para la rotura de este EPS en moléculas señal (Gray y Rolfe, 1990). Müller *et al.*, (1988) han observado que un mutante de *R. meliloti* que produce EPS sin sustituciones piruvato presenta también fenotipo Inf-. Por otra parte, los mutantes *exoG* de esta misma especie, que forma EPS I de bajo peso molecular, pero no el de alto , forman nódulos efectivos a una baja eficiencia en relación con la cepa salvaje (Long *et al.*, 1988). Es posible que ambas formas, la de alto y la de bajo peso molecular, tengan funciones simbióticas (Reuber *et al.*, 1991). Las formas de EPS de bajo peso molecular podrían estar implicadas en inducir las nodulinas, pues en los mutantes *exoH* se ha comprobado que no se inducen la mayoría de estas proteínas específicas del nódulo (Leigh *et al.*, 1987).

Los EPSs de *R. leguminosarum* pueden llevar distinto grado de sustituciones acetato e hidroxibutirato. Se ha querido ver en la variación en

contenido y puntos de unión de estos compuestos no glucosídicos una relación con el rango de hospedador (Phillip-Hollingsworth *et al.*, 1989a y 1989b), lo cual se relacionaba con que los genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* podían influenciar el patrón de acetilación (Phillip-Hollingsworth *et al.*, 1989b). Sin embargo, posteriormente O'Neill *et al.* (1991) demostraron que el grado de esterificación y puntos de sustituciones acetato y 3 hidroxibutirato no estaban relacionados con el rango de hospedador, pues las diferencias dentro de cada biovar eran tan grandes como las diferencias entre las distintas biovariedades (O'Neill *et al.*, 1991). Así mismo, Canter-Cremers *et al.*, (1991a) han publicado que la distribución de grupos acetilo no está determinada por el plásmido pSym.

Otro hecho que apoya que los EPS puedan actuar como moléculas señal son los resultados de la adición de EPS. Así, Djordjevic *et al.*, (1987) demostraron que la adición de EPS o de fragmentos de él cuando se inoculan plantas con mutantes Exo⁻ de *Rhizobium* sp. NGR234 o de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* restauraba el fenotipo Fix⁺. Solamente la adición de EPS aislado de la cepa salvaje correspondiente era efectivo, mientras que la adición de EPS heterólogo no corrige el defecto fenotípico. En dos publicaciones recientes (Battisti *et al.*, 1992; Urzainqui y Walker, 1992) se ha mostrado que la adición de EPS de bajo peso molecular restaura el defecto fenotípico de los mutantes *exoA*, *exoB*, *exoF* y *exoH* de *R. meliloti*. La forma activa es el tetrámero y la adición de EPS de bajo peso molecular de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* o de *R.* sp. NGR234 no restaura el defecto fenotípico. Contrariamente a Djordjevic *et al.*, (1987) la adición del EPS de alto peso molecular sin embargo, no es activo (Battisti *et al.*, 1992).

Sin embargo, el requerimiento de estructuras específicas no está apoyado por el experimento en el que la cepa NGR234 ha sido manipulada

genéticamente para producir EPS I de *R. meliloti* en lugar del EPS de NGR234 (Gray *et al.*, 1991). Esta cepa híbrida es capaz de formar nódulos organizados en *Leucaena leucocephala* (las cepas Exo⁻ de *R. sp.* NRR234 sólo forman callos). Estos nódulos no fijan nitrógeno, pero tienen canales de infección y bacteroides dentro de las células de las plantas. Esto claramente demuestra que EPS heterólogo es suficiente para desarrollar el nódulo más allá de la barrera impuesta en los mutantes Exo⁻. Sin embargo, se necesita EPS homólogo para llevar a la formación de nódulos Nod⁺ Fix⁺ (Gray *et al.*, 1992).

1.6 Beta Glucanos.

Las cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* producen β -1,2 glucanos (York *et al.*, 1980; Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979), que están presentes en el periplasma y también son excretados al medio. Este polisacárido es un homopolímero formado por 17 a 24 restos de glucosa unidos solamente por enlaces β -1,2 posiblemente en una configuración cíclica (Dell *et al.*, 1989). Aunque pueden estar modificados con sustituciones aniónicas (Batley *et al.*, 1987; Hisamatsu *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1987), hay menos posibilidad de variación con estos polisacáridos que en el caso de EPSs o LPSs. *B.japonicum* no produce β -1,2 glucanos, pero en su lugar produce oligómeros más pequeños de residuos de glucosa con uniones β -1,3 y β -1,6, que pueden tener una función similar (Miller *et al.*, 1990; Miller y Gore, 1992). También se encuentran largas cadenas de β -1,4-glucanos (celulosa) al menos en la superficie de *R. leguminosarum* (Smit *et al.*, 1987).

Los β -1,2-glucanos deben tener un papel universal en la interacción de *Rhizobium* y *Agrobacterium* con sus plantas hospedadoras. Las mutaciones en dos genes cromosómicos, llamados *ndvA* y *ndvB* (Dylan *et al.*, 1986),

hacen que en *R. meliloti* esté afectada la síntesis de β -1,2-glucanos. Estos mutantes forman nódulos que no fijan nitrógeno, no hay formación de bacteroides, ni de canales de infección (Geremia *et al.*, 1987). Además, las mutaciones en loci homólogos y funcionalmente intercambiables de *A.tumefaciens* (*chvA* y *chvB*) resultan en mutantes avirulentos defectivos en la adhesión (Puvanesarajah *et al.*, 1985). Las mutaciones en *chvA* y *chvB* también bloquean la nodulación de la cepa *A.tumefaciens* (pSym *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*), que normalmente nodula *Phaseolus* (Van Veen *et al.*, 1987). Se ha demostrado que los mutantes *chv* de *A.tumefaciens* no se adhieren a las células de las plantas (Douglas *et al.*, 1982). Así mismo, Dylan *et al.*, (1990b) han demostrado que los mutantes *ndv* de *R. meliloti* están seriamente afectados en su unión a raíces de alfalfa.

La secuencia de ADN del locus *ndvA* codifica una proteína de 67.1 kd que es homóloga a un gran número de proteínas transportadoras bacterianas dependientes de ATP. El mayor grado de relación fue con HlyB de *E.coli*, una proteína implicada en la exportación de hemolisina, y con el producto del gen *mdr* de células de mamífero que también es homólogo a HlyB. Basándose en estos resultados se ha sugerido que la proteína NdvA estaría implicada en la exportación de β -1,2-glucano desde la membrana interna donde es sintetizado al espacio periplásmico (Stanfield *et al.*, 1988), similar a lo que ocurre con la proteína ChvA (Cangelosi *et al.*, 1989). Esto es apoyado por la observación de que los mutantes *chvA* siguen produciendo β -1,2-glucanos, pero estos quedan confinados en el citoplasma. Por el contrario, los mutantes en *ndvB* o *chvB* no forman las moléculas, *ndvB* y *chvB* codifican para una proteína de la membrana interna, que aparece en electroforesis en SDS como una proteína de 235 kd, que se piensa que es la intermediaria en la síntesis. El gen *ndvB* ha sido secuenciado y codifica una proteína de 319 kd

sin que se haya encontrado homología con otras proteínas conocidas (Cangelosi *et al.*, 1989; Ielpi *et al.*, 1990).

Coronado *et al.*, (1989), usando como sondas los genes *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti*, han encontrado homologías con todas las especies de rizobios analizadas, indicando que estos genes se encuentran altamente conservados. Además en todas las especies la localización es cromosómica.

La producción de β -1,2-glucanos aumenta a baja osmolaridad y parece ser esencial para una osmoadaptación adecuada (Zorrieguetta *et al.*, 1990; Dylan *et al.*, 1990a), una propiedad que podría jugar un papel en la nodulación. Dylan *et al.*, (1990a) han mostrado que el glucano es requerido para la adaptación a baja osmolaridad y que los mutantes *ndvA* y *ndvB* presentan propiedades fenotípicas que sugieren una alteración de la membrana externa, resultado del fallo a la osmoadaptación. El estudio del mutante *ndvB R. meliloti* GRT21s y de un revertiente simbiótico GRT21sR, ha permitido identificar al menos dos grupos de proteínas de membrana que están ligadas con la proteína NdvB y/o la síntesis de β (1-2) glucano (Soto *et al.*, 1992). Estas características incluyen pérdida de motilidad, aumento de la resistencia a la infección por fagos y aumento de la sensibilidad a ciertos antibióticos. La biosíntesis de β 1,6 y 1,3 glucanos producidos por *Bradyrhizobium* también están osmóticamente regulados y su función debe ser análoga a la de los β -1,2-glucanos (Miller y Gore, 1992). Los glucanos, también podrían actuar durante la infección "eliminando" (o concentrando) moléculas señal de bajo peso molecular o compuestos de defensa que son generados por la planta, en el sentido de que las moléculas actúan como protectoras frente a las reacciones de defensa de la planta (Gray *et al.*, 1992). En relación a este aspecto está el aumento de la formación de canales de

infección y nodulación de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* en trébol por la adición de β -1,2-glucanos purificados (Abe *et al.*, 1982).

Aunque, está claro que las mutaciones que suprimen la producción de β -1,2-glucanos afectan seriamente a la capacidad de nodular normalmente, aún no está claro que la pérdida del glucano por si misma sea responsable de estos defectos. Las mutaciones en *chv* y *ndv* son altamente pleitrópicas, afectando a otras características de superficie de la bacteria (Dylan *et al.*, 1990b). Así, por ejemplo, se han aislado pseudorevertientes a partir de nódulos rosados de alfalfa a baja frecuencia después de la inoculación con mutantes *ndv* de *R. meliloti*. Aunque, estos pseudorevertientes fueron aislados por su capacidad simbiótica de fijar nitrógeno no habían recuperado la capacidad de producir glucano ni de osmoadaptación (Dylan *et al.*, 1990b).

1.7 Lectinas.

En 1974, Bohlool y Schmidt propusieron que los rizobios reconocen específicamente a su planta huésped a través de una interacción específica entre las lectinas (glucoproteínas) de la planta y los polisacáridos de superficie de la bacteria. A partir de esta hipótesis, una de las interacciones más estudiadas ha sido la unión de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a raíces de trébol. Trifolina A es la lectina aislada de raíces de trébol que se une específicamente a los EPS y LPS de la biovariedad *trifolii*, además, trifolina también se une a ciertos carbohidratos de trébol y podría actuar como un puente entre la planta y la bacteria (Dazzo y Truchet, 1983). Dazzo *et al.*, (1984) propusieron que la interacción específica entre la trifolina A y el receptor bacteriano era el determinante del reconocimiento y el primer acontecimiento en el proceso de unión. Sin embargo, se encontraron hechos que eran contradictorios con la hipótesis de las lectinas, ya que se demostró

que las bacterias también se unían por medio de las lectinas a otras leguminosas que no era su planta hospedadora habitual (Dazzo y Hubbel, 1973; Seegers y La Rue, 1985). A pesar de todo, hoy en día es cada vez más evidente que las lectinas juegan un papel importante en el proceso de infección. Estas proteínas están localizadas en extremos apicales de los pelos radicales, que son precisamente los puntos susceptibles de ser infectados por los rizobios (Diaz *et al.*, 1986). El gen que codifica para la lectina de guisante ha sido clonado y transferido a trébol blanco usando *A. rhizogenes* como vector. Las raíces transgénicas de trébol son susceptibles de la infección con *R. leguminosarum* bv. *viceae* y, aunque la mayoría de los nódulos son Ndv-, algunos se desarrollan suficientemente hasta fijar nitrógeno (Diaz *et al.*, 1989) Estos autores afirman que el rango de hospedador en la simbiosis *Rhizobium*--leguminosa está determinado, al menos parcialmente, por una interacción simbiótica con las lectinas. Una idea reciente es que las lectinas podrían reconocer los lípolidogacáridos que son especificados por los genes *nod*.

2. Material y Métodos.

2.1 Estirpes bacterianas.

Las diferentes estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, así como sus características más relevantes se indican en la Tabla 1.

2.2 Medios de cultivo.

Para el crecimiento de *Rhizobium* se han utilizado los medios TY e YMT:

TY:

Triptona (DIFCO)	5 g
Extracto de levadura (DIFCO)	3 g
CaCl ₂	0,9 g
Agua (desionizada)	1.000 ml
Agar (medio sólido, PANREAC)	15 g

Los medios se esterilizan, en todos los casos, en autoclave a 115°C durante 30 minutos.

YMT:

Triptona (DIFCO)	5 g
Extracto de levadura (DIFCO)	2,5 g
CaCl ₂	0,6 g
Manitol	10 g
Agua desionizada	1.000 ml
Agar (medio sólido, PANREAC)	15 g

Como medio mínimo para *Rhizobium* se ha empleado el medio de Robertsen *et al.* (1981) modificado:

K ₂ HPO ₄	0,3 g
---------------------------------	-------

KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,15 g
CaCl ₂	0,05 g
FeCl ₃	0,006 g
NaCl.....	0,05 g
Glutamato sódico.....	1,1 g
Manitol.....	10 g
Biotina.....	0,0002 g
Pantotenato cálcico.....	0,0001 g
Agua (desionizada).....	1.000 ml
Agar purificado (BBL).....	15 g (medio sólido)

Se ajusta el pH a 6,8-7,0 y se esteriliza normalmente.

Para la obtención de $\beta(1-2)$ glucanos se ha utilizado el medio GYM (Ielpi *et al.*, 1990):

Glutamato.....	0,17 g
Extracto de levadura.....	0,2 g
Manitol.....	3,64 g
K ₂ HPO ₄	0,17 g
KH ₂ PO ₄	0,17 g
MgSO ₄	0,06 g
NaCl.....	1,17 g
CaCl ₂	0,073 g
Agua desionizada.....	1.000 ml

Los cultivos de *E.coli* se han llevado a cabo en medio de Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989):

Triptona (DIFCO).....	10 g
Extracto de levadura (DIFCO).....	5 g

NaCl.....	5 g
Agua (desionizada).....	1.000 ml
Agar (medio sólido).....	15 g

2.3 Antibióticos.

Se prepararon soluciones 100 veces concentradas en agua desionizada o en 50% de etanol. Las preparadas en agua desionizada se esterilizaron a través de unidades de filtración Minisart^R NML (Sartorius) de 0,2 micras de tamaño de poro. Las concentraciones finales en el medio fueron las siguientes: tetraciclina (Tc, SIGMA), 10 mg/l; kanamicina (Km, MORGENS), 50 mg/l para *E.coli* y 180 mg/l para *Rhizobium*; ampicilina (Ap, SIGMA), 200 mg/l; cloranfenicol (Cm, SIGMA), 50 mg/l.

2.4 Conservación de cepas bacterianas.

A corto plazo las cepas bacterianas se conservaron a 4°C en cultivos en estrías en los medios correspondientes. La conservación a largo plazo se realizó por congelación de cultivos líquidos con glicerol 20% a -70°C.

2.5 Plásmidos.

Los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo se relacionan en la Tabla 2. Los mapas de restricción de los vectores más frecuentemente utilizados (pUC18, pSUP102 y pLAFR1) se presentan en la Figura 4. Los plásmidos de nueva construcción se describen en el apartado correspondiente de Resultados.

2.6 Plantas.

Se han utilizado las leguminosas leñosas:

-*Acacia cyanophylla* y

-*Acacia melanoxylon*

y las leguminosas herbáceas:

-*Lotus corniculatus* cv "Empire"

-*Trifolium incarnatum* cv. "Dixie"

-*T. repens* cv. Louisiana Nolin (trébol blanco)

-*T. subterraneum* cv mt Barker (trébol subterráneo)

-*Phaseolus vulgaris* cv. Strike (judía)

-*Vicia hirsuta*

2.7 Cultivo axénico de plantas.

Se ha seguido la técnica descrita por Olivares *et al.*, (1980). Cuando las plántulas alcanzan 1-2 cm de longitud se colocan en condiciones asépticas en tubos de 20 x 200 mm (25 x 250 para *Phaseolus*) que contienen 15 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. En el caso de las acacias se les elimina la cubierta y se coloca una plántula por tubo. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubren en su mitad inferior con papel opaco y se llevan a una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

2.7.1 Solución nutritiva.

Para los cultivos hidropónicos de las plantas se ha utilizado la solución nutritiva libre de nitrógeno descrita por Rigaud y Puppo (1975):

KH_2PO_40,2 g

$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,2 g

KCl.....	0,2 g
CaSO ₄	0,12 g
EDTA FeNa ₂	0,025 g
Na ₂ MoO ₄	0,004 g
Agua desionizada.....	1.000 ml

Microelementos

H ₃ B ₃ O ₃	0,018 g/l
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	0,020 g/l
ZnSO ₄	0,030 g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,002 g/l

Antes de esterilizar a 115°C durante 30 minutos se ajusta el pH a 7,2. con KOH

2.7.2 Esterilización y germinación de las semillas.

Las semillas de *A. cyanophylla* y *A. melanoxylon* tienen una cubierta impermeable por lo que deben someterse a un proceso de escarificación, y a la vez esterilización. El tratamiento se realiza por inmersión de las semillas en ácido sulfúrico concentrado durante 20 y 25 minutos respectivamente y en agitación. Una vez alcanzados los tiempos indicados se elimina el ácido sulfúrico en condiciones de esterilidad, se realizan rápidos y frecuentes lavados con agua estéril (5-6 lavados) y se dejan en imbibición durante 24 horas. Tras este periodo, se llevan en condiciones asépticas, a placas de Petri que contienen un círculo de papel de filtro humedecido. Las placas con las semillas se mantienen en oscuridad en una cámara con un ciclo de temperatura entre 18 y 25°C hasta que germinan, como mínimo cinco días.

Las semillas de *Lotus*, *Trifolium* y *Vicia* se esterilizan en superficie por inmersión en 2,5% de HgCl₂ durante 9 minutos y 30 segundos. Transcurrido

este tiempo, se lavan 5-6 veces con agua estéril y se dejan en imbibición durante 2 a 4 horas. Posteriormente, se extienden las semillas en condiciones asépticas en placas de Petri que contienen papel de filtro humedecido, finalmente se dejan en oscuridad a 28 °C durante 24 a 48 horas. Las semillas de *Lotus* germinan mejor si se escarifican con ácido sulfúrico durante 10 minutos.

Para las semillas de *Phaseolus*, que tienen una cubierta muy permeable, se esterilizan del siguiente modo: primero se lavan las semillas con agua estéril y en agitación hasta eliminar el fungicida (color rosa) con el que viene tratadas las semillas comerciales. A continuación se mantienen 5 min en etanol (96%), lavando posteriormente varias veces con agua estéril. Después de este proceso las semillas son tratadas durante 3 min con lejía al 20%. Tras lavar con agua estéril 5-6 veces, se reparten en placas de Petri con papel de filtro humedecido y se llevan a 28°C hasta su germinación..

2.8 Inoculación de las plantas.

La inoculación de las plántulas de acacia se hizo tras 7 días de permanencia en la cámara de cultivo, añadiendo a cada tubo 0,5 ml de un cultivo líquido de la cepa correspondiente (10^8 - 10^9 células/ml).

En el caso de las leguminosas herbáceas, estas se inocularon un día después de llevarlas a la cámara de cultivo con 0,1 ml del cultivo bacteriano (10^7 células/ml).

2.9 Reaislamiento de *Rhizobium* de los nódulos.

Se toman los nódulos de la planta y se esterilizan en superficie con $HgCl_2$ al 0,25% durante 5 minutos. Seguidamente se lavan con agua estéril 5-6 veces y se trituran individualmente, en condiciones asépticas, con una

varilla de vidrio. Una gota del triturado se extiende sobre placas de medio TY adicionado o no del correspondiente antibiótico, y se incuban a 28°C durante 4-5 días.

2.10 Cruces entre *E. coli* y *Rhizobium*.

2.10.1 Cruces triparentales

La transferencia de plásmidos derivados de pRK290 de *E. coli* a *Rhizobium* se realizó según el modelo de cruce triparental, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980). En un tubo eppendorf se mezclan la cepa donadora, movilizadora, y receptora en proporción 1:1:1, se centrifuga durante 1 min. en una microfuga y se resuspende finalmente en 0,1 ml de medio de cultivo TY. Esta suspensión se pone sobre filtro Millipore de 0,45 μm de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente depositado sobre medio TY sólido. La placa se incuba durante una noche a 28°C; finalmente se recoge la mezcla y se siembran las diluciones adecuadas sobre medio selectivo. La selección de los transconjugantes se hizo en medio mínimo para *Rhizobium* adicionado del antibiótico para cuya resistencia codifica el plásmido que se transfiere.

2.10.2 Cruces simples.

En este caso se utiliza como cepa donadora y movilizadora *E. coli* S17-1. Esta cepa se utiliza para movilizar plásmidos que contienen la región *mob*

de RP4 (pSUP102, PSUP202, PSUP5011), ya que contiene y expresa los genes de transferencia (*tra*) de RP4 integrados en el cromosoma. Para los cruces simples se mezclan las razas donadora y receptora en proporción 1:1 y procediendo después de forma similar a como se ha descrito para los cruces triparentales.

2.11 Preparación de células competentes de *E.coli* y transformación.

Las células competentes de *E. coli* se prepararon según la técnica descrita esencialmente por Lederberg y Cohen (1974). Con un cultivo de la cepa de *E.coli* que se va transformar se inocula al 1% un matraz de medio LB y se incuba en agitación a 37°C. Cuando el cultivo alcanza una D.O.600nm de 0,6, se deja enfriar el cultivo en hielo durante 10 min. y se centrifuga a 12.000 g durante 5 min a 4°C. Las células se resuspenden en un volumen igual de MgCl₂ 0,1 M frío y se centrifugan a 3.000 g, 5 min. a 4°C. A continuación se resuspenden en 1/2 de CaCl₂ 0,1 M frío. Tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 min, las células se centrifugan a 3.000 g 5 min. a 4°C y se resuspenden suavemente en 1/10 volumen de CaCl₂ 0,1 M, 20% glicerol frío. Se reparten en alícuotas de 200 ml en tubos Eppendorf preenfriados y se conservan a -70°C. La competencia de las células se mantiene al menos durante 3 meses. Las soluciones empleadas para este método se esterilizan en autoclave y se conservan a 4°C.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983) modificada. Se sacan los tubos de -70°C y se dejan en hielo 15-20 min. Entonces, se le añade 0,1-1

µg de ADN contenido en un volumen de 1-25 µl, incubándose en hielo durante 30 min. Posteriormente se le somete a un choque de calor de 5 min. a 37°C (o alternativamente 2 min. a 42°C). Se dejan 5 min. en hielo diluyendo a continuación en 1 ml de LB. Posteriormente se incuba a 37°C 1 h 30 min. Tras este tiempo, las células se siembran en placas de LB adicionadas del antibiótico correspondiente.

2.12 Aislamiento de ADN total de *Rhizobium*.

El aislamiento del ADN total se se hizo según un método especialmente diseñado para *Rhizobium* en el departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania). De un cultivo bacteriano en fase logarítmica de la cepa elegida se toman 1,5 ml y se centrifugan durante 2 minutos en una microfuga. Las células se lavan con 0,5 ml de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) adicionado de N-lauroil sarcosina al 0,1%. Después se resuspenden las células en 1 ml de NaCl 1M y la suspensión se dejan aproximadamente 2 horas a 4°C. Se centrifuga durante 2 minutos, se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende hasta homogeneidad en 0,25 ml de sacarosa al 20% en TE. Después se adicionan 0,25 ml de TE con lisozima (5 mg/ml), se agita por inversión, incubándose durante 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionan 0,1 ml de TE con N-lauroil sarcosina al 5% y pronasa 10 mg/ml dejándose incubar una hora más a 37°C. Posteriormente, se adicionan 70 µl de acetato sódico 3 M, pH 5,2; 0,2 ml de mezcla fenol/cloroformo y 0,2 ml de mezcla de fenol. Se agita en vortex y se centrifuga durante 5 minutos recogiendo a continuación la fase superior acuosa. A esta última, se adiciona 0,3 ml de cloroformo, se agita de nuevo en vortex centrifugando a continuación durante 5 min. La fase superior se recoge en un nuevo tubo y se le adiciona 0,7 ml de isopropanol enfriado a -

20°C, se mezcla bien y se deja durante 15 min a -70°C. Después se centrifuga durante 15 min, el precipitado se lava con 0,5 ml de etanol al 70%, se seca al vacío y se resuspende en 50 µl de 1/10 TE.

La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento es la siguiente:

-mezcla de fenol:

fenol.....50 g

8-hidroxiquinoleína.....0,05 g

Tris-HCl 0,1 M pH 8.....50 ml

Se mantiene una noche en agitación y oscuridad y se guarda a 4°C.

-mezcla fenol-cloroformo:

mezcla de fenol.....25 ml

cloroformo.....24 ml

alcohol isoamílico.....1 ml

2.13 Obtención de ADN plásmidico.

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se empleó el método de desnaturalización alcalina de Ish-Horowicz y Burk (1981). De un cultivo bacteriano de la cepa de *E. coli* elegida se toman 1,5 ml y se centrifugan en una microfuga durante 1 min. El sobrenadante se retira con cuidado y las células se resuspenden en 0,1 ml de solución I, dejándose 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 0,2 ml de solución II, se mezcla por inversión rápida 3-4 veces y se deja en hielo 5 min. Se añaden entonces 0,15 ml de tampón acetato potásico pH 4,8, frío, se agita por inversión del tubo y se incuban en hielo durante 5 min. A continuación se centrifuga y el sobrenadante se pasa a un nuevo tubo. Este sobrenadante se extrae con 1 volumen de fenol-cloroformo. Se pasa la fase acuosa a otro tubo

y se le añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se mezcla y se deja 10-15 min a -70°C . Se centrifuga 15 min y el precipitado se lava con etanol 70%, a continuación se deseca al vacío y se resuspende en 20-50 μl de TE.

La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento es la siguiente:

-solución I:

glucosa.....50 mM
 Tris-HCl.....25 mM
 EDTA.Na₂.....10 mM

-solución II:

Sodio dodecil sulfato (SDS).....1%(p/v)
 NaOH.....0,2 N

-tampón acetato potásico:

acetato potásico 5 M.....60 ml
 ácido acético glacial.....11,5 ml
 H₂O hasta.....100 ml

El pH se lleva a 4,8 con ácido acético.

-TE:

Tris-HCl pH 8.....10 mM
 EDTA-Na₂.....1 mM

Todas las soluciones se esterilizan en autoclave y se conservan a 4°C .

2.14 Determinación de la concentración de ADN.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Se mide la absorbancia de la solución de ADN en agua o en TE a 260 y 280 nm utilizando como blanco agua o TE sin ADN. La concentración de ADN en la muestra se calcula respecto a los valores estándar de

DO_{260nm} 1 para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla, y 20 µg/ml de oligonucleótidos. La relación DO_{260nm}/DO_{280nm} se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz ultravioleta frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

2.15 Restricción de ADN.

Las digestiones totales de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima. Las reacciones contenían habitualmente entre 0,5-1µg de ADN y 0,5-10U del enzima en volúmenes finales de 20-50 µl y se llevaron a cabo en los tampones y a las temperaturas recomendadas por los proveedores (BOEHRINGER), incubando durante 2 horas.

2.16 Separación e identificación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa del 0,7%, sumergidos en TBE a 120 V durante 2-3 h. Las soluciones de carga contenían 2 µl de tampón indicador por cada 10 µl de las muestras de ADN.

Para la visualización del ADN, los geles se tiñen por inmersión en una solución de bromuro de etidio durante 15 min. y después de varios lavados con agua se exponen a luz ultravioleta de 260nm en un transiluminador. Las

fotografías de los geles se han realizado con cámara POLAROID MP-4 usando película POLAROID 667.

El tamaño de los fragmentos de restricción se estima por interpolación gráfica en curvas del logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa del fragmento, usando como patrón de peso molecular los fragmentos de restricción con *Hind* III y *Hind* III + *Eco* RI del fago I.

Las soluciones empleadas en este procedimiento tienen la siguiente composición:

-TBE:

Tris-Base	10,8 g
ácido bórico	5,5 g
EDTA.NA ₂	0,93 g
H ₂ O hasta	1.000 ml

-Tampón indicador de carga:

sacarosa	40% (p/v)
azul de bromofenol	0,25%

-Bromuro de etidio:

Se diluyen 3-4 gotas de una solución de bromuro de etidio (10mg/ml) en aproximadamente 1 l de agua.

2.17 Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Cuando fue necesaria la obtención de fragmentos de restricción para ser usados como sonda en experimentos de hibridación o para ser clonados, se siguió el método de unión a papel DEAE-celulosa NA-45 (SCHLEICHER & SCHELL) descrito en Sambrook *et al.*, (1989).

Los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción se separan por electroforesis en geles de agarosa. Para una recuperación efectiva se cargan en geles de 0,5 cm de espesor muestras conteniendo 3-5 μg de ADN. Los fragmentos se separan por electroforesis y se visualizan como se indica en la sección anterior. Una vez identificado el fragmento de ADN que se quiere extraer, se hace un corte justo delante de esta banda, en el sentido de la migración, y se coloca un trozo adecuado de membrana DEAE celulosa NA-45 activada. El gel se coloca de nuevo bajo corriente eléctrica con cuidado de no sumergir el gel y cuando el ADN está adherido a la membrana se termina la electroforesis. Se introduce la membrana en un tubo Eppendorf y se añaden 0,3 ml de tampón de elución (Tris-HCl 20mM; NaCl 1,5mM; EDTA.Na₂ 1mM; pH 7,5), se incuba un mínimo de una hora a 68°C, agitando de forma manual. Cuando todo el ADN se ha separado de la membrana se retira ésta y se añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se lleva a -20°C un mínimo de 5 horas para precipitar el ADN. Transcurrido este tiempo se centrifuga durante 15 min. El precipitado se lava con etanol 70%, se seca al vacío y se resuspende en 10 μl de TE.

Las membranas de DEAE celulosa NA-45 se activan da acuerdo al siguiente procedimiento: primero las secciones de membrana se mantienen durante varias horas en NaCl 1,5 M y a continuación se lavan varias veces en agua. Las membranas se pueden mantener durante varios meses a 4°C en EDTA 1mM. Previo a su uso, las membranas deben equilibrarse con el tampón de electroforesis durante al menos 20 min.

2.18 Ligación de fragmentos de restricción con extremos cohesivos.

Los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción se mezclaron con vector linearizado en un sitio de restricción compatible para la ligación, en proporción vector/inserto de 1/3. Se usan normalmente 0,1-0,2 µg de ADN de vector. La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 20 ml en presencia de T4 ADN ligasa (BOEHRINGER) y en el tampón suministrado por el fabricante de la enzima, durante una noche a 16°C.

2.19 Separación e identificación de plásmidos por electroforesis en gel de agarosa.

Para la identificación de los plásmidos albergados en *Rhizobium* se ha seguido el método de Eckhardt (1978) modificado por Rosenberg *et al.*, (1982).

Se toman 10^7 - 10^8 células de un cultivo en TY líquido de la raza a estudiar y se lavan con 0,2 ml de N-lauroil sarcosina 0,1% en TE. Las células se resuspenden en 40 µl de solución de lisozima, y se transfieren rápidamente al pocillo de un gel de agarosa vertical al 0,7% en TBE. Transcurridos 10-15 min, la lisis se completa por adición de 40 ml de solución II y finalmente se añaden cuidadosamente 100 µl de solución III. Los pocillos se sellan con agarosa al 0,7% y la electroforesis se lleva a cabo durante 1 hora a 10 mA y 3 horas a 40 mA en TBE.

Las soluciones empleadas en este procedimiento tienen la siguiente composición:

-solución de lisozima:

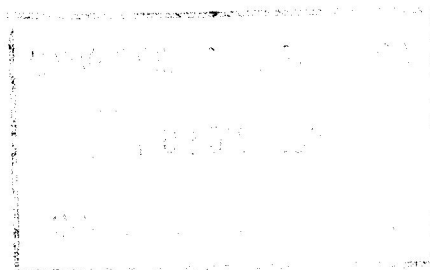
lisozima 1mg/ml, ARNasa I 100 mg/ml, 0,05% azul de bromofenol y ficoll 20% en tampón TBE.

-solución II:

ficoll 10%, SDS 0,2% en TBE.

-solución III:

ficoll 5%, SDS 0,2% en TBE,



2.20 Transferencia de ADN a filtros de nylon.

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

El ADN plasmídico o bien los fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa. Una vez fotografiado el gel, el ADN se somete a depurinación ácida por inmersión del gel en una solución de HCl 0,25M durante 20 min. Posteriormente se desnaturaliza en una solución NaOH 0,5M; NaCl 1,5M durante 2 x 15 min. y se neutraliza finalmente con una solución Tris-HCl 0,5M; NaCl 3M, pH 7 durante 2 x 15 min. El gel se lava posteriormente con agua destilada.

Sobre una superficie regular se coloca un papel Whatman 3MM y encima el gel. Sobre este se coloca un filtro de nylon de tamaño similar al del gel y sobre el filtro 2 piezas de Whatman del mismo tamaño (el filtro de nylon y las piezas de 3MM se saturan previamente en tampón 20xSSC durante 30 min). Sobre todo el sistema se coloca papel secante y sobre éste un peso de aproximadamente 1 kg. El papel secante se sustituye cuando sea necesario. El sistema está conectado con un reservorio de tampón 20xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7), que permite el flujo continuo de tampón a través de todo el sistema. Normalmente las transferencias se realizan durante una noche.

Una vez realizada la transferencia, el filtro se lava en 2xSSC para eliminar los restos de agarosa, se seca a temperatura ambiente y se cuece al vacío a 120°C durante 30 min.

2.21 Preparación de sondas de ADN para hibridación.

2.21.1 Marcaje radioactivo

El ADN de fragmentos aislados de geles de agarosa se marcó *in vitro* con α -³²PdATP por el procedimiento de corte y desplazamiento ("nick translation") descrito por Rigby *et al.*, (1977).

2.21.2 Marcaje no radioactivo.

La preparación de sondas de ADN no radioactivas se ha llevado a cabo según la técnica comercializada por BOEHRINGER (Mannheim, FRG) que consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda, utilizando una mezcla de hexanucleótidos como cebador, ADN polimerasa I (fragmento "Klenow") y la incorporación de digoxigenina-dUTP como nucleótido marcado. La presencia de este nucleótido sintético en el ADN se detecta con una reacción inmunológica específica.

Las reacciones de marcaje se hacen normalmente con 2 µg de ADN desnaturalizado en un volumen de reacción de 20 µl y durante una noche.

2.22 Hibridación ADN-ADN.

2.22.1 Hibridación en colonias

Se ha utilizado el método descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Las colonias de *E.coli* se crecen sobre papel de nitrocelulosa estéril y depositado sobre una placa de LB. De este modo se crecen las colonias durante una noche a 37°C. A continuación se procede al lisado de las mismas. Se cortan 4 piezas de papel Whatman 3MM del tamaño de los filtros de nitrocelulosa y se colocan en sendas bandejas. Cada una de las piezas de papel 3MM se satura con una de las siguientes soluciones;

10% SDS

solución de desnaturalización (NaOH 0,5N; NaCl 1,5M).

solución de neutralización (NaCl 1,5M; Tris-HCl 0,5M pH 7,4).

2x SSC.

Se elimina el exceso de líquido en las bandejas. Si el papel Whatman está demasiado húmedo las colonias pueden difundir durante la lisis. Se toma un filtro de nitrocelulosa y se coloca, con las colonias hacia arriba, sobre el papel impregnado en SDS. Después de exponer durante 3 minutos en la solución de SDS, se transfiere a la segunda hoja de papel 3MM, que ha sido saturada con solución de desnaturalización (5 min). Con esta solución se consigue la lisis de las bacterias y la desnaturalización del ADN. A continuación se transfiere el filtro a la tercera pieza de papel Whatman, que ha sido saturada con solución de neutralización (5 min). Se transfieren los filtros a la cuarta pieza de papel Whatman, saturada con 2xSSC y se mantiene durante 5 min. Se deposita el filtro sobre papel Whatman 3MM seco con las colonias hacia arriba y se deja secar a temperatura ambiente durante al menos 30 min. Este proceso se sigue con cada uno de los filtros que queremos hibridar. Una vez secos todos los filtros de nitrocelulosa se colocan entre dos hojas de papel Whatman 3MM seco y se fija el ADN cocinando durante 2 h a 80°C al vacío. El

ADN inmovilizado en los filtros se hibrida con una sonda marcada radioactivamente del modo que se indica a continuación.

El filtro de nitrocelulosa se introduce en una bolsa de plástico de tamaño adecuado, y se le añade solución de prehibridación: formamida 50%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ equimolares 50 mM, 10x solución Denhardt (1x Denhardt: polivinilpirrolidona 0,2%; ficoll 400 0,2%; seroalbúmina de buey 0,2%), 3xSSC; ADN de timo desnaturalizado 500 mg/ml. Se incubaba un mínimo de 3 horas a 42°C. Transcurrido este tiempo se retira la solución de prehibridación y se añade la solución de hibridación, que es la misma más el ADN marcado (previamente desnaturalizado). Se incubaba a 42°C durante una noche.

Una vez realizada la hibridación, el filtro se lava con una solución 1xSSC; SDS 1%, dos veces a temperatura ambiente y dos veces más con 0,1xSSC, SDS 1% a 65°C. Una vez seco, el filtro se cubre con papel celofán y se coloca frente a una película autoradiográfica Kodak X-Omat S y se deja a temperatura ambiente de 2 a 7 días.

2.22.2 Hibridación con sonda no radiactiva.

Se han seguido las indicaciones del kit de BOEHRINGER. El filtro de nylon se incubaba en una solución de prehibridación (20ml/100cm²) compuesta de 5xSSC; N-lauroil sarcosina 0,1%; SDS 0,02%; formamida 50%; y agente bloqueante al 2% a 42° durante al menos 3 h. Esta solución se sustituye por la solución de hibridación (5ml/100cm²), que es la misma a la que se ha añadido el ADN sonda desnaturalizado, y se incubaba a 42°C un mínimo de 6h. Terminada la hibridación los filtros son lavados siguiendo las recomendaciones de los fabricantes del kit, y a continuación se usan para la detección inmunológica.

La detección no radioactiva de las bandas de hibridación se efectuó usando el protocolo de detección quimioluminiscente tal y como indican los proveedores. La impronta de las señales se realizó sobre películas Kodak X-OMAT. Las bandas de hibridación aparecen en un intervalo entre los 5 min y las 3 h.

2.23 Secuenciación de ADN.

Para la secuenciación del ADN adyacente a las inserciones de Tn5 se han construido plásmidos derivados de pUC18 que llevan el ADN mutado junto al brazo izquierdo del Tn5 (portador de la resistencia a kanamicina) o el brazo derecho. Para obtener un ADN suficientemente limpio como para ser secuenciado se procedió a la obtención de los ADNs usando el kit comercial de purificación de ADN Magic Miniprep (PROMEGA).

La secuenciación del ADN se ha llevado a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), siguiendo básicamente la técnica descrita por Hattori y Sakai (1986) para la secuenciación de plásmidos, y utilizando la versión 2.0 del kit comercial Sequenase (United State Biochemical) basado en una ADN polimerasa del bacteriófago T7 manipulada, según describen Tabor y Rhichardson (1987).

El ADN plasmídico en primer lugar se somete a una desnaturalización alcalina. A 18 μ l de solución de ADN (2 μ g) se le añaden 2 μ l de NaOH 2N y después de mezclar se deja a temperatura ambiente 5 min. Posteriormente se añaden 2 μ l de acetato amónico 2M pH 4,5, y se precipita con 66 μ l de etanol. Como cebador se ha usado el oligonucleótido sintético 3'CGCAGGACTTGCCTTGAAA 5', diseñado a partir de la secuencia de Tn5, y sintetizado por ISOGEN BIOSCIENCE. La reacción de marcaje y de

terminación se llevaron a cabo tal como indica el protocolo del kit de Sequenasa.

Los geles fueron preparados sobre placas Sequi-gen (BIORAD) de 38 x 52,5 cm. Una de las placas del sistema se trata con dimetildiclorosilano (SIGMA), con objeto de formar una capa hidrófoba que previniese la adhesión del gel, y sea fácilmente arrastrado hacia la otra. Se usan separadores de 0,25 mm y geles de acrilamida al 6%, 7M urea en tampón TBE. Se cargan 3 µl de muestra, una vez que han sido desnaturalizadas durante 3 min a 95°C. La electroforesis se efectúa sobre geles precalentados a 50°C durante 2 h 15 min a 1900 V. Se han efectuado dos cargas de cada una de las muestras, separadas por un intervalo de tiempo de dos horas.

Terminada la electroforesis el gel es lavado con una solución agua:metanol:ácido acético (80:15:5), durante varios minutos, y se transfiere a papel Whatman 3MM. El gel se cubre con papel celofán y se seca al vacío a 80°C durante 1 h. Una vez seco se expone sobre película de autoradiografía (HyperfilmTM β-Max, AMERSHAN) durante 2 días a 1 semana a temperatura ambiente.

El revelado de las películas se hizo en cuarto oscuro usando como revelador Neutol Liquid NE (AGFA) y como fijador N FIX 172 (NEGRA), utilizando las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

2.24 Construcción del banco de genes de *Rhizobium* sp. GRH2.

2.24.1 Vector

El vector utilizado ha sido el cósmido pLAFR1 (Friedman *et al.*, 1982) digerido con *EcoRI*.

2.24.2 Preparación del ADN de GRH2 digerido parcialmente en fragmentos *EcoRI* de aproximadamente 20 kb,

El tamaño de los fragmentos debe ser próximo a 20 kb, para que al unirse al cósmido tenga un tamaño adecuado para el empaquetamiento en las cabezas de fago I.

En primer lugar se obtiene el ADN total de la cepa GRH2 a partir de 50 ml de cultivo en TY siguiendo el método descrito en el apartado 2.11. Una vez conocida la concentración de ADN se estudian las condiciones óptimas para obtener fragmentos *EcoRI* de aproximadamente 20 kb. En este caso se han usado 0,5 unidades de enzima por cada 3,3 μ g de ADN total, manteniéndolo durante 40 min a 37°C en un volumen de 12 μ l. La digestión se para con la adición de 1,5 μ l de EDTA 0,5M pH8 a cada reacción y llevándolas a hielo.

El ADN parcialmente digerido de este modo se fracciona en gradiente de sacarosa continuo del 10 al 40% para seleccionar los fragmentos adecuados para el empaquetamiento. Para la formación del gradiente se utilizó un mezclador de gradiente 2117 (LKB Pharmacia) y una bomba peristáltica Master flex. Se parte de dos soluciones (20 ml) de 10 y 40% (p/v) de sacarosa en STE (1M NaCl; 20mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM EDTA). El ADN parcialmente digerido debe estar disuelto en tampón STE a una concentración aproximada de 1 mg/ml. Una vez formado el gradiente en un tubo de polialómero ultratransparente, se añade el ADN tras haberlo calentado 5 min a 65 °C para disociar los agregados de ADN y en una cantidad no mayor de 0,5mg. Se centrifuga en rotor SW28 a 20°C a 25.000 rpm durante 24 horas. Una vez acabado el gradiente el tubo se pincha por abajo y se recogen manualmente fracciones de 750 ml. Se analiza una de

cada tres fracciones en electroforesis en gel de agarosa, tomando 40 ml de la fracción a los que se añaden 2 ml de una solución de azul de bromofenol. Cada una de las fracciones adecuadas se reparte en 4 tubos de microfuga (180ml/tubo) a los que se añade 320 ml de agua y 1 ml de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se mantiene a -20°C durante una noche. Una vez precipitado se resuspende en un pequeño volumen de TE. Este ADN es el utilizado para la ligación.

2.24.3 Ligación y transducción.

Para promover la formación de concatámeros la concentración de ADN en la reacción de ligación debe ser mayor a 200 mg/ml, para ello la reacción se lleva a cabo en un volumen de 5 ml. La ligación se mantiene a 16°C durante toda la noche. Esta ligación es utilizada para el empaquetamiento *in vitro* en cabezas de fago, para lo cual se utilizó el kit de empaquetamiento comercial de BOEHRINGER. Las etapas que se dan durante este proceso de empaquetamiento son iguales a las que se dan *in vivo*. El kit provee las proteínas de fago necesarias para el corte del ADN, empaquetamiento de éste en las cabezas de fago y formación de las colas. El empaquetado, ADN ligado y proteínas del fago mezclados según las indicaciones de los proveedores se incuban 1 h a temperatura ambiente. A continuación se añaden 500 ml de tampón SM (Tris-HCl 10mM; MgSO_4 10mM; gelatina 0,01%; pH 7,4) y 20 ml de cloroformo.

Las células empleadas para la transducción, *E.coli* HB101, son crecidas en medio TB + MgSO_4 10mM + maltosa 0,2%, para inducir los receptores del fago. Se centrifugan a baja velocidad, 480 g, y se resuspenden en la mitad del volumen inicial en MgSO_4 10mM. A las células preparadas de este modo se les añade el empaquetado, se incuban a 37°C

durante 15 min. A continuación se añade LB y se sigue incubando a 37 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo se centrifuga y se siembra en placas de LB tetraciclina las diluciones apropiadas.

Se extrajeron los cósmidos a 20 clones, y tras digerir con *EcoRI*, se observó que el 70% de los clones eran recombinantes. En total se obtuvieron aproximadamente 4500 clones lo cual es suficiente para tener representada cualquier secuencia con una probabilidad del 99%.

Para la conservación del banco de genes, se recogieron todas las colonias crecidas en las placas con medio LB líquido, se adicionó glicerol estéril a una concentración final del 20% y se guardó en alícuotas de 2ml a -70°C.

2.25 Medida de la concentración de hexosas.

Para la medida de la concentración de azúcares (hexosas) se ha utilizado el método del fenol-sulfúrico (Chaplin, 1986)

En primer lugar se mezclan 200 ml de la muestra con 200 ml de reactivo A. A continuación se añade 1 ml de ácido sulfúrico rápida y directamente sobre la la solución sin que toque las paredes del tubo. Se dejan las soluciones 10 min en reposo antes de agitar vigorosamente. Se determina la absorbancia a 490 nm después de al menos 30 min. Para la curva patrón se prepararon diluciones con glucosa. Este método es adecuado para concentraciones de hexosas de 5 a 100 mg/ml. Para concentraciones mayores hubo que diluir las muestras hasta alcanzar un valor dentro de este rango.

-reactivo A:

5% fenol (p/v) disuelto en agua. Esta solución es estable indefinidamente.

