

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de polisacáridos en Rhizobiaceae y su relación con la interacción planta bacteria

Geremía, Roberto Alejandro

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Geremía, Roberto Alejandro. (1989). Biosíntesis de polisacáridos en Rhizobiaceae y su relación con la interacción planta bacteria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2205_Geremia.pdf

Cita tipo Chicago:

Geremía, Roberto Alejandro. "Biosíntesis de polisacáridos en Rhizobiaceae y su relación con la interacción planta bacteria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2205_Geremia.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DE POLISACARIDOS EN RHIZOBIACEAE Y SU
RELACION CON LA INTERACCION PLANTA BACTERIA.

Autor: Roberto Alejandro Geremia

Director: Rodolfo Augusto Ugalde

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones

Bioquímicas "Fundación Campomar", Buenos Aires,
ARGENTINA.

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1989

*L. 205
Ej: 2.*

Ilvira, Gregorio Luciano, y el que
esta por llegar;
Fui madre y hermanos,
y la memoria de Pío, Ray y Mary;
y todos los que me apoyaron.

Liber to

*Si para recobrar lo recobrado
tuve que primero perder lo perdido
doy por bien sufrido lo sufrido,
por bien llorado lo llorado,
porque por fin aprendí
que lo que la alfalfa tiene de flores
vive de lo que tiene sepultado.
(Tomado de un graffiti).
la alfalfa en el original es el árbol*

*There is something intrinsically good-natured about all symbiotic relations...
The lives of the cell. Lewis Thomas*

*El periodismo, el trabajo científico, los horarios de ferrocarril, las balanzas, la policía, y los
letreros de las fondas persiguen, si bien se mira, un fin común: poner en conocimiento de las
gentes datos que permanecen ignorados.
Memorias del ángel gris. Alejandro Dolina.*

*Se miente más de la cuenta
por falta de fantasía,
también la realidad se inventa.
Antonio Machado.*

AGRADECIMIENTOS

Durante seis años en este Instituto he tenido el placer de conocer mucha gente, algunos llegaron hace poco, otros no estan, y otros permanecen. Por eso no es de extrañar la longitud de esta lista incompleta.

A los integrantes del Comité Directivo del Instituto. Ellos no solo me brindaron la oportunidad de realizar esta tesis en el Instituto, sino que también me apoyaron en momentos críticos.

A la Dra. Clara R. Krisman, con quien me inicié en la investigación, por el estímulo que me dió.

Al Dr. Luis F. Leloir que me abrió las puertas del laboratorio y me enseñó a divertirme trabajando.

Al Dr. Rodolfo A. Ugalde. Su espíritu pujante, su actitud abierta, su disposición docente y su capacidad científica dejaron en mí una valiosa impronta.

Al Dr. Giménez con quien compartí momentos gratos y de quien recibí valiosas enseñanzas.

En el transcurso de estos años compartí estantes, reactivos y bromas con Marta Blumenfeld, Diana Tolmasky, Sonia Cavaignac, Nora Iñon, Angeles Zorreguieta, Jorge A. Coira, Antonio D. Uttaro y Cristina Bertinetti. Ellos me soportaron y me ayudaron.

A Juan José Miret por su amistad.

Hubo también con quienes compartí charlas, café y cerveza. Ellos son: Angel Cataldi, Juan Carlos Bossio, Norberto Iusem, Viviana Lepek, Jose Luis Affranchino, Liliana Simonini, Alberto Ochoa, Graciela Boccaccio, Eduardo Cafferata, Osvaldo Podhaicer, Margarita Bosch y Laura Bover. Siempre los tendré presentes.

A Patricia Marini, Roberto Macina, Silvia Curutchet, Martín Radrizzani, Fernando Ardila, Silvia Gonzalez, Silvia Moreno, Ariel Willner, Olga Castro, Alejandro Petroni, Sergio Trombetta, Eduardo Guillen, Carlos Semino, Mariana Stein y Manuel Gidekel por diversos motivos.

A Los Dres. Oscar Burrone, Luis Quesada Allue, Manuel Garcia Patrone, Ricardo A. Wolosiuk, Roberto Staneloni, Carlos A.C. Frascch por dedicarme tiempo, materiales, reactivos e ideas.

Al Dr. Armando J. Parodi por un viaje en coche.

A todos aquellos con quienes compartí los cursos de Química Biológica Superiores en que participé (a los alumnos también).

A Soledad Gimenez y Margarita Mazzardi,

Pancho Irusta, Salvador Genovese, Jorge Pinto y Alejandro Micalis,

Aida Pelman.

Mary Boxer, Beile Wolf, Tilda Saba, Manon Angel e Irene Cangiano,

Marta Bravo, Alejandra Raimondi y Susana Raffo,

Patricia Bardi, Cristina Argüelles, Georgina y Francisco Varde.

De alguna manera u otra ellos contribuyeron a que este trabajo pueda realizarse.

A Norberto Malarini, no solo por su amistad, sino también por su trabajo.

A Luis Millara por la excelente colaboración prestada.

Al CONICET, por la ayuda económica brindada.

Abreviaturas

<i>A.</i>	<i>Agrobacterium</i>
Ac.	Acido
<i>B.</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
cpm	cuentas por minuto
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
Fig.	Figura
kb	Kilo pares de bases
KDa	Kilo Dalton
min	minutos
ml	mililitros
pi150	Proteína de 150 KDa intermediaria en la síntesis del glucano β (1-2)
pi235	Proteína de 235 KDa intermediaria en la síntesis del glucano β (1-2)
<i>R.</i>	<i>Rhizobium</i>
SBTI	Inhibidor de tripsina extraido de poroto de soja
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
Tris	2 amino-2-hidroximetil-1,3-propano diol
UDPGlc	5'uridina difosfato-glucosa
UDP[¹⁴ C]Glc	5'uridina difosfato-glucosa cuyo resto de glucosa esta uniformemente marcado con ¹⁴ C
TCA	Acido tricloroacético
μ Ci	micro Curie

Glosario

Buffer:	Solución de sustancias químicas que mantienen constante el pH.
Downstream:	Hacia el extremo 3' de un gen.
Upstream:	Hacia el extremo 5' de un gen.
K _{AV} :	Volúmen total-Volúmen de elución/Volúmen total-Volúmen de exclusión
Pulso:	Incubación con un sustrato radioactivo.
Chase:	Es la adición de sustrato no radioactivo luego de un pulso con el mismo sustrato radioactivo.
Pellet:	Material que queda adherido al fondo de un tubo luego de una centrifugación.
nod-box:	Secuencia consenso de 25 bases presentes en todos las unidades. transcripcionales inducibles por los flavonoides vegetales.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
El ciclo del nitrógeno.	1
Fijación biológica de N.	1
La familia <i>Rhizobiaceae</i>	3
Infección y transformación de plantas por <i>A. tumefaciens</i>	4
Plásmido pTi.	4
Desarrollo del proceso patogénico	6
Adhesión de la bacteria a la célula vegetal	7
Procesamiento y transferencia del T-DNA	8
Integración del T-DNA	8
Respuesta a la expresión del T-DNA	8
Simbiosis <i>Rhizobium</i> -planta	9
Reconocimiento	11
Organogénesis del nódulo	12
Crecimiento de los hilos de infección	12
Nódulos	12
Estructura y organización de los genes relacionados con la nodulación	14
Mutantes Nod	14
Mutantes Fix	14
Mutantes Inf	16
Mutantes Exo	16
Mutantes Ndv	16
Factores del hospedador involucrados en la nodulación	17
Polisacáridos Producidos por <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i>	19
OBJETIVOS	21
CAPITULO 1	
MAPEO BIOQUIMICO DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA PROTEINA INTERMEDIARIA DE 235 KDa	
RESUMEN	22
INTRODUCCION	23
RESULTADOS	24
Síntesis de novo de proteínas en <i>Agrobacterium</i>	26
Hallazgo de una proteína intermediaria de 150 kDa.	27
Producción de glucano β (1-2) in vivo e in vitro por la cepa SC5	28
Hallazgo de proteínas intermediarias de distintos tamaños	29
Estudios sobre la síntesis in vitro del glucano β (1-2) por las cepas ME32, ME112 y ME101	29
Presencia del glucano β (1-2) en extractos celulares de las cepas ME32, ME35 y ME101	31
Mapeo bioquímico del gen de la pi235	31
Estudio de la región <i>chvB</i> en la mutantes ME2, ME116, y ME32	33
Actividad β -galactosidasa unida a membranas internas en la cepa ME101	34

Digestión parcial con tripsina de membranas internas de <i>A. tumefaciens</i>	35
Síntesis de glucano β (1-2)	35
Formación de polipéptidos intermediarios	36
Digestión parcial de la pi235 previa incubación con UDP[¹⁴ C]Glc	37
Digestión parcial con tripsina de membranas internas de cepas que producen proteínas intermediarias de menor peso molecular	38
DISCUSION	39
CAPITULO 2	
CARACTERIZACION DE UNA MUTANTE DE <i>RHIZOBIUM MELILOTI</i> QUE PRODUCE PSEUDONODULOS EN ALFALFA	43
RESUMEN	44
INTRODUCCION	45
RESULTADOS	
Estudio del proceso infectivo en <i>R. meliloti</i> GRT21s.	46
Producción de exopolisacárido	46
Ausencia de glucano β (1-2) en sobrenadantes de cultivo de <i>R. meliloti</i> GRT21s	49
Ausencia del glucano β (1-2) en extractos celulares provenientes de <i>R. meliloti</i> GRT21s	50
Síntesis "in vitro" del glucano β (1-2)	52
Ausencia de la pi235	53
Estudios de movilidad	55
DISCUSION	57
CAPITULO 3	
COMPLEMENTACION DE <i>R. meliloti</i> GRT21s CON LAS REGIONES <i>chvB</i> y <i>ndvB</i>	58
RESUMEN	59
INTRODUCCION	60
RESULTADOS	
Plásmidos usados para complementar <i>R. meliloti</i> GRT21s	61
Movilidad	62
Formación de báculo de pastor, mancha hialina e hilo de infección	62
Nodulación y reducción de acetileno	62
Estudios realizados con las cepas TU1 y RAG1	65
DISCUSION	66
CAPITULO 4	
RELACION DE LOS LOCI <i>chvB</i> y <i>ndvB</i> CON EL GRADO DE POLIMERIZACION DEL GLUCANO β (1-2)	67
RESUMEN	68
INTRODUCCION	69
RESULTADOS	
Presencia del glucano β (1-2) en extractos celulares de las cepas SC1 y SC15	70
Síntesis in vitro del glucano β (1-2)	71
Glucano β (1-2) presentes en extractos celulares de las cepas ME41, ME43, y ME72	73
Tratamiento de las membranas internas de <i>R. meliloti</i> con tripsina	73
La cepa SC1 produce una proteína intermediaria de 150 kDa	74

Proteínas intermediarias producidas por las cepas SC15, TU1, y RAG1	76
DISCUSION	77
CAPITULO 5	
HOMOLOGIA ENTRE LAS REGIONES <i>chvB</i> y <i>ndvB</i>	78
RESUMEN	79
INTRODUCCION	80
RESULTADOS	
Sondas utilizadas	81
Mapa de la zona homóloga a la región <i>chvB</i> en <i>R.meliloti</i> GR4	82
Mecanismo de la complementación de <i>R.meliloti</i> GRT21s con los plásmidos pTY12 y p186.	83
DISCUSION	85
CONCLUSIONES GENERALES	86
MATERIALES Y METODOS	87
METODOS BACTERIOLOGICOS	88
Bacterias y plásmidos utilizados	88
Condiciones de cultivo	89
Uso de antibióticos	89
Conservación de las cepas	89
Obtención de cepas merodiploides	90
Ensayo de movilidad	90
METODOS BIOQUIMICOS	
Extracción de polisacáridos bacterianos	90
Purificación y caracterización del β (1-2) glucano	91
Caracterización del exopolisacárido	92
Preparación de membranas internas	92
Síntesis in vitro de glucano β (1-2)	92
Digestiones parciales con tripsina	93
Cromatografía Líquida de Alta Presión	93
Dosaje de actividad de β -galactosidasa	93
Síntesis de novo de proteínas	93
Electroforesis en gel de poliacrilamida	94
METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	95
Preparación de DNA total	95
Preparación de DNA plásmidico	95
Métodos de purificación de ácidos nucleicos	96
Extracción fenólica	96
Extracción con fenol:cloroformo	96
Extracción con cloroformo	96
Precipitación etanólica	96
Digestiones con endonucleasas de restricción	96
Electroforesis en gels de agarosa	96
Aislamiento de los fragmentos de DNA por electroelución	97
Marcado por "random priming"	97
Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa ("Southern blot") e hibridización	98
ENSAYOS DE INTERACCION BACTERIA PLANTA	99
Preparación de las planta	99

Tinción de raíces no fijadas y observación
microscópica
Ensayo de nodulación
Ensayo de reducción de acetileno

BIBLIOGRAFIA

99
99
99
100

INTRODUCCION

El ciclo del nitrógeno.

En las condiciones en que se desarrolla la vida en este planeta el Nitrógeno, a pesar de ser el más abundante, es el nutriente limitante para el desarrollo de la misma. El Nitrógeno forma parte de las proteínas, los ácidos nucleicos y algunos azúcares de los seres vivos. Su ciclo⁽¹⁰⁶⁾ se muestra en la Fig. 1. El mecanismo que transforma el Nitrógeno atmosférico (N_2) en NH_3 se denomina fijación del N_2 . Este proceso puede ser realizado en forma química en condiciones artificiales (fábricas de fertilizantes, por ejemplo), o por seres vivos. Este último proceso se conoce con el nombre de fijación biológica del N_2 , y hasta el presente sólo ha sido descrito en organismos procariontes. El NH_3 así producido se incorpora al ciclo biológico como se muestra en la Figura 1.

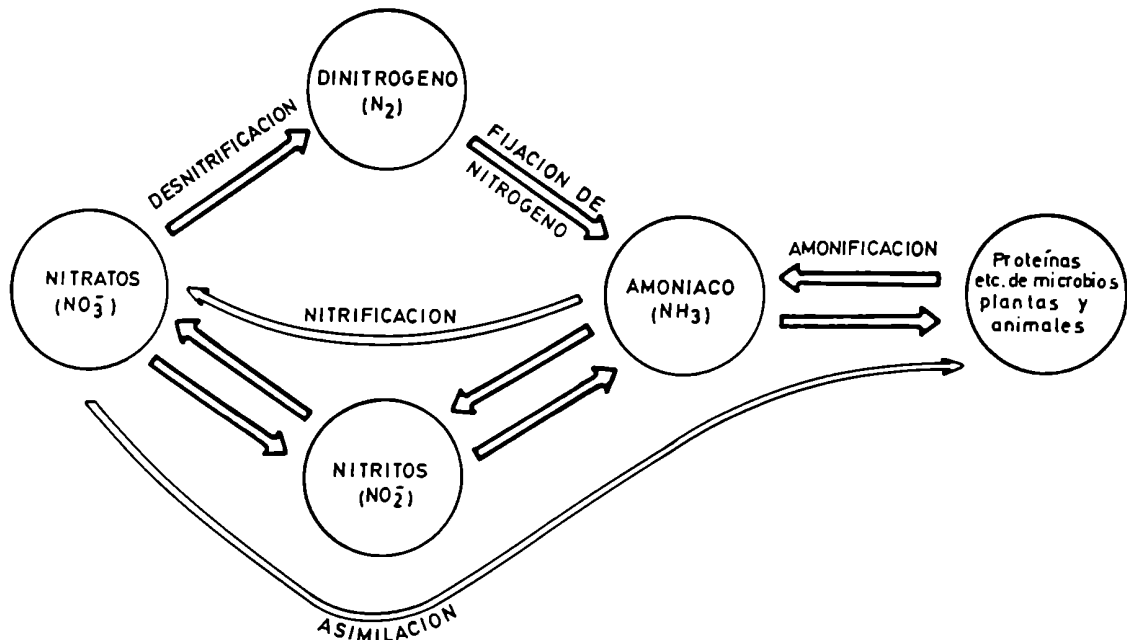


Figura 1) REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CICLO DEL NITROGENO.

El proceso de nitrificación consiste en la oxidación biológica de NH_3 a NO_3^- . Los microorganismos responsables de este proceso se denominan bacterias nitrificantes. Estas bacterias acoplan la oxidación de NH_3 a la fijación de CO_2 . Se dividen en dos grupos principales: uno que oxida NH_3 a NO_2^- (género *Nitrosomonas*), y otro que oxida NO_2^- a NO_3^- (género *Nitrobacter*). Si bien estas bacterias están ampliamente distribuidas, son difíciles de cultivar en el laboratorio. El NO_3^- producido es absorbido mejor por los vegetales, pero se lava fácilmente del suelo, mientras que el NH_3

se retiene mejor en el suelo, pero no es bien absorbido por los vegetales. Por estas razones no puede adjudicarse un rol beneficioso o pernicioso a estos microorganismos. El proceso de desnitrificación consiste en la reducción biológica de NO_3^- a N_2 . El dinitrógeno formado se reintegra a su reservorio, cerrando el ciclo. Este proceso lo llevan a cabo los géneros *Pseudomonas*, *Micrococcus*, y *Thiobacillus*⁽¹⁰⁶⁾.

Fijación biológica de N_2 .

La cantidad de N_2 reincorporado a la atmósfera en forma gaseosa mediante el proceso de desnitrificación es de tal magnitud que, de no existir el proceso inverso, se llegaría a un estancamiento de la vida en el planeta debido a un ayuno de N.

TABLA I
Ejemplos de fijadores libres de N ⁽¹⁰⁶⁾

	Género o tipo	Especie
Anaerobios estrictos	<i>Clostridium</i> <i>Desulfovibrio</i>	<i>C.butyricum</i> <i>D.vulgaris</i>
Facultativos	<i>Klebsiella</i> <i>Bacillus</i> <i>Citrobacter</i>	<i>K.pneumoniae</i> <i>B.polymixa</i> <i>C.freundii</i>
Microaerófilos	<i>Azospirillum</i> <i>Xanthobacter</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Azorhizobium</i>	<i>A.braziliensis</i> <i>X.flavus</i> <i>B.japonicum</i> <i>A.caulinodans</i>
Aerobios	<i>Azotobacter</i> <i>Azotococcus</i> <i>Azomonas</i> <i>Beijerinckia</i>	<i>A.vinelandii</i> <i>A.agilis</i> <i>A.macrocytogenes</i> <i>B.indica</i>
Fototrofos (anaerobios)	<i>Chromatium</i> <i>Chlorobium</i>	<i>C.vinosum</i> <i>C.limicola</i>
Fototrofos (facultativos)	<i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i>	<i>R.rubrum</i> <i>R.palustris</i>
Fototrofos (microaerófilos)	<i>Plectonema</i> <i>Lyngibia</i>	<i>P.boryanum</i> <i>L.aestuarii</i>
Fototrofos (aeróbicos)	<i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Calothrix</i>	<i>A.cylindrica</i> <i>N.muscorum</i> <i>sp.</i>

Los microorganismos fijadores del N_2 pueden hacerlo en vida libre (Tabla I), o en asociación con plantas. Algunos ejemplos de asociación con la planta se muestran en la Tabla II. La contribución general a la fijación del N_2 por parte de los microorganismos de vida libre es de importancia, pero no es suficiente para mantener constantes los niveles de N asimilable. Por otra parte, los organismos vivos que con mayor velocidad reciclan los nutrientes son las plantas. Uno de los elementos que tiene vital importancia en la riqueza del suelo es el N asimilable. En los suelos pobres, este elemento se puede suplementar con fertilizantes, pero dichos productos presentan problemas a nivel de su producción

(alto costo), transporte hasta el lugar de uso, así como por la producción de residuos que producen contaminación ambiental. Por estas razones cobran mucha importancia los fijadores simbióticos del N_2 , en especial los que participan de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El N_2 fijado por esta vía es el que más contribuye a la fijación global del N_2 , y es el más útil ya que se fija al comienzo de la cadena alimentaria (la planta). Por otra parte el cultivo racional de leguminosas produce suelos ricos en N, lo que puede independizar a otros cultivos del uso de fertilizantes.

Tabla II
Algunos ejemplos de asociación simbiótica⁽¹⁰³⁾

Género	Especie	Planta
<i>Rhizobium</i>	<i>meliloti</i>	alfalfa
	<i>leguminosarum</i>	<i>Vicia</i> .sp.
	<i>trifolii</i>	trébol
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	soja
<i>Frankia</i>	<i>casuarina</i>	pino australiano
	<i>alnus</i>	Aliso

La familia Rhizobiaceae

Según el *Manual Bergey*⁽⁷²⁾ las bacterias agrupadas en la familia *Rhizobiaceae*, usualmente tienen forma de bastón y no contienen endosporas. Las células son aeróbicas, gram-negativas, y móviles. Utilizan varios carbohidratos y acumulan gran cantidad de material mucoso extracelular. Una característica distintiva de este género es que sus especies habitan en el suelo, e interactúan con plantas, ya sea para causar enfermedades o para formar nódulos fijadores del N_2 . Los géneros que la constituyen, y algunos ejemplos de interacción se muestran en la Tabla III.

TABLA III

Género	Especie	Interacción con plantas (Fuente)
<i>Agrobacterium</i>	<i>tumefaciens</i>	Produce tumor de agalla ⁽⁴⁰⁾ .
	<i>rhizogenes</i>	Produce proliferación de raíces en el sitio de infección ("hairy root disease") ⁽⁷⁰⁾ .
<i>Rhizobium</i>	<i>meliloti</i>	De crecimiento rápido, produce nódulos en raíces de alfalfa ⁽⁴¹⁾ .
	<i>trifolii</i>	De crecimiento rápido, produce nódulos en raíces de trebol ⁽⁴¹⁾ .
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	De crecimiento lento, produce nódulos en raíces de soja ⁽⁴¹⁾ .
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	De crecimiento lento, produce nódulos en tallos y raíces de <i>Seisbania.rostrata</i> ⁽³⁸⁾ .

Las especies más estudiadas desde los puntos de vista bioquímico, genético, y de interacción con la planta son *A. tumefaciens* y *R. meliloti*. En esta tesis se han realizado estudios sobre la interacción de estas especies con la planta. En las próximas secciones se muestran aspectos relevantes de estas bacterias, y de los procesos de tumorigenicidad y nodulación.

Antes de entrar en ellos conviene destacar que éstas y otras especies de esta familia poseen plásmidos de tamaño variable. En estos plásmidos está codificada la información necesaria para producir el efecto patológico o simbiótico en la planta. No obstante para el éxito de estos procesos son necesarios genes cromosomales. En el caso de *A. tumefaciens*, el plásmido se denomina pTi⁽²⁶⁾ (por Tumor inducing); y en *Rhizobium* se denomina pSym (por Symbiosis)⁽²⁵⁾.

Infección y transformación de plantas por *A. tumefaciens*.

A. tumefaciens induce la formación de tumores de agalla en plantas gimnospermas y angiospermas dicotiledóneas^(40,97). La respuesta patológica resulta de la expresión en la planta, de la información contenida en el pTi, que se transfiere desde la bacteria a la célula vegetal^(52,65,100). Para el desarrollo del proceso virulento son necesarios genes bacterianos localizados tanto en el cromosoma⁽³⁴⁾, como en el pTi. Pasaremos a describir con más detalle este plásmido.

Plásmido pTi.

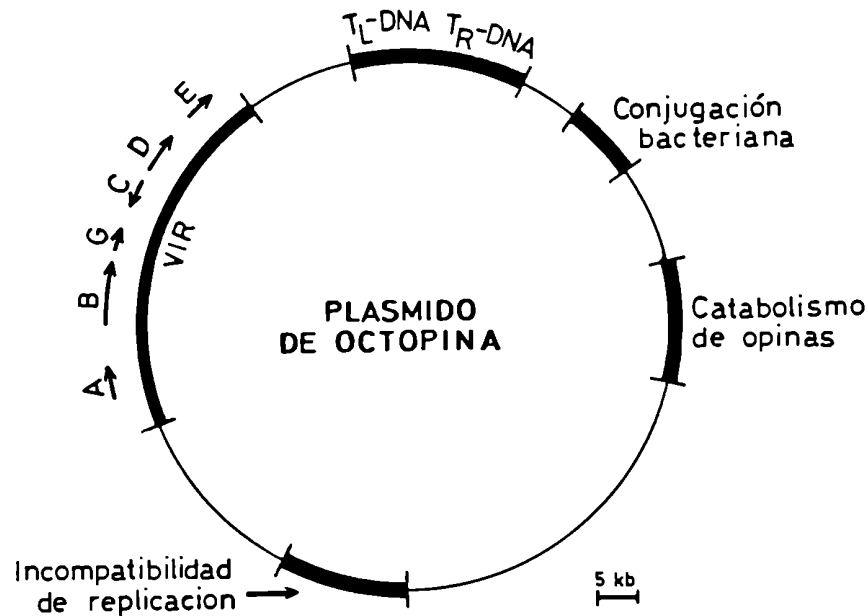


Figura 2) ORGANIZACION DEL PLASMIDO pTi QUE CODIFICA POR LA SINTESIS Y CATABOLISMO DE OCTOPINA.

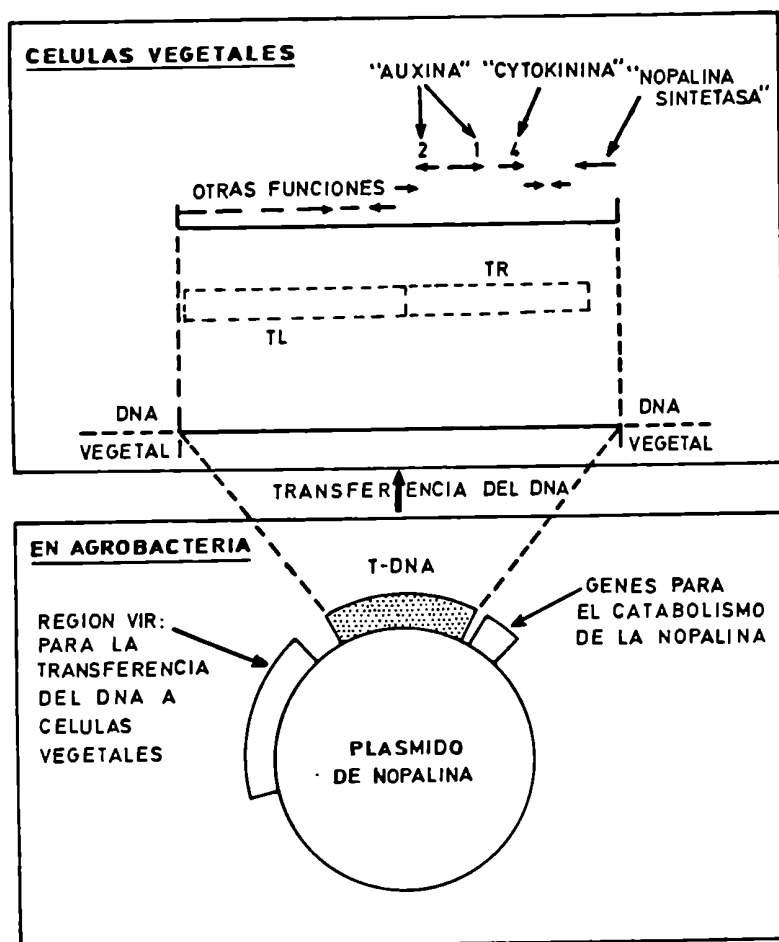


Figura 3) ORGANIZACION DEL PLASMIDO pTi QUE CODIFICA POR LA SINTESIS Y CATABOLISMO DE NOPALINA Y SU INSERCIÓN AL GENOMA VEGETAL.

El plásmido pTi (Fig. 2 y 3)^(42.129,138) es un plásmido conjugativo, que confiere virulencia a las cepas de *A. tumefaciens* que lo poseen⁽⁵⁾. La información requerida para la formación de tumores está contenida en dos zonas:

1) **T-DNA (transferred DNA):** Es el fragmento de DNA que se transfiere a la célula vegetal y se integra al genoma de ésta. Se describirá el caso de un pTi que codifica para la síntesis de octopina (Fig. 2). Esta zona se divide en dos partes⁽¹³⁸⁾: TR (right) y TL (left). En el TR-DNA se encuentran los genes más conservados: los genes *onc* y los responsables de la síntesis de opinas. Los genes *onc* inducen la formación de tumores y determinan la morfología de los mismos^(5,42.138.153). Estos genes, en

este caso, son tres: dos de ellos (*iaaM* e *iaaH*)⁽¹⁵²⁾ codifican para la síntesis del ácido 3-indolacético (una auxina), y el otro (*tmr*)⁽¹⁵²⁾ para la síntesis de isopentenil adenosina 5'-monofosfato. (una citoquinina). Las auxinas y citoquininas son hormonas vegetales que regulan el crecimiento y la morfología de las células vegetales. Las opinas son metabolitos no usuales derivados de azúcares o aminoácidos (v.g. octopina, nopalina). Se han descrito dos genes localizados en el TR-DNA para el metabolismo de la octopina^(92,136), uno de los cuales (*ocs*) codifica para la enzima que produce la condensación de piruvato y arginina para dar octopina (octopina sintetasa). El otro gen descrito (*ors*) aparentemente codifica para una proteína de membrana que transportaría la octopina al exterior de la célula vegetal. En el TR-DNA también existen otros tres genes (*gene0'*, *gene1'*, y *gene2'*) involucrados en la síntesis de manopina y agropina. Las opinas son metabolizadas por *A. tumefaciens*, y las enzimas para su captación y catabolismo están codificadas en otra región del pTi ubicada fuera del T-DNA⁽⁴²⁾. Los genes presentes en el T-DNA se expresan en la planta (Fig. 3).

2) Región *vir*. En esta región se encuentran los loci relacionados con el procesamiento y transferencia del T-DNA^(112,129,138,154). La localización y organización de estos loci se muestran en las Fig. 2 y 3, y las funciones propuestas se describen en la Tabla IV.

TABLA IV

LOCUS	GENES*	PROPIEDADES
A	1	Esencial para la virulencia. Constitutivo. De membrana interna. Detecta molécula señal ⁽⁸⁶⁾ .
B	11	Esencial para la virulencia. Proteínas de membrana. Transportan T-DNA ⁽¹⁵¹⁾ .
C	2	Involucrado en especificidad de hospedador ^(17,155) .
D	5	Esencial para la virulencia. Cortan T-DNA, y se unen a él ^(60,69) .
E	2	Involucrado en especificidad de hospedador Son extracelulares. Se unen a ss DNA inespecíficamente ^(62,153,155) .
G	1	Esencial para la virulencia. Regulador positivo de los loci <i>vir</i> . Se sospecha que su producto es de localización citosólica ⁽⁹¹⁾ .

* Se refiere al número de marcos abiertos de lectura obtenidos por secuenciación del DNA.

Es posible clasificar los pTi en distintos grupos de acuerdo al tipo de opina que metabolizan las células que lo contienen⁽¹³⁶⁾.

Desarrollo del proceso patogénico.

El desarrollo del proceso infeccioso se muestra en la Figura 4. El proceso puede dividirse en cinco etapas⁽⁵⁾: 1) Adhesión de la bacteria a la célula de la planta, 2) Procesamiento del T-DNA, 3) Transferencia del T-DNA a la célula vegetal, 4) Integración del T-DNA en el genoma de la célula vegetal, y 5) Formación del tumor y síntesis de opinas.

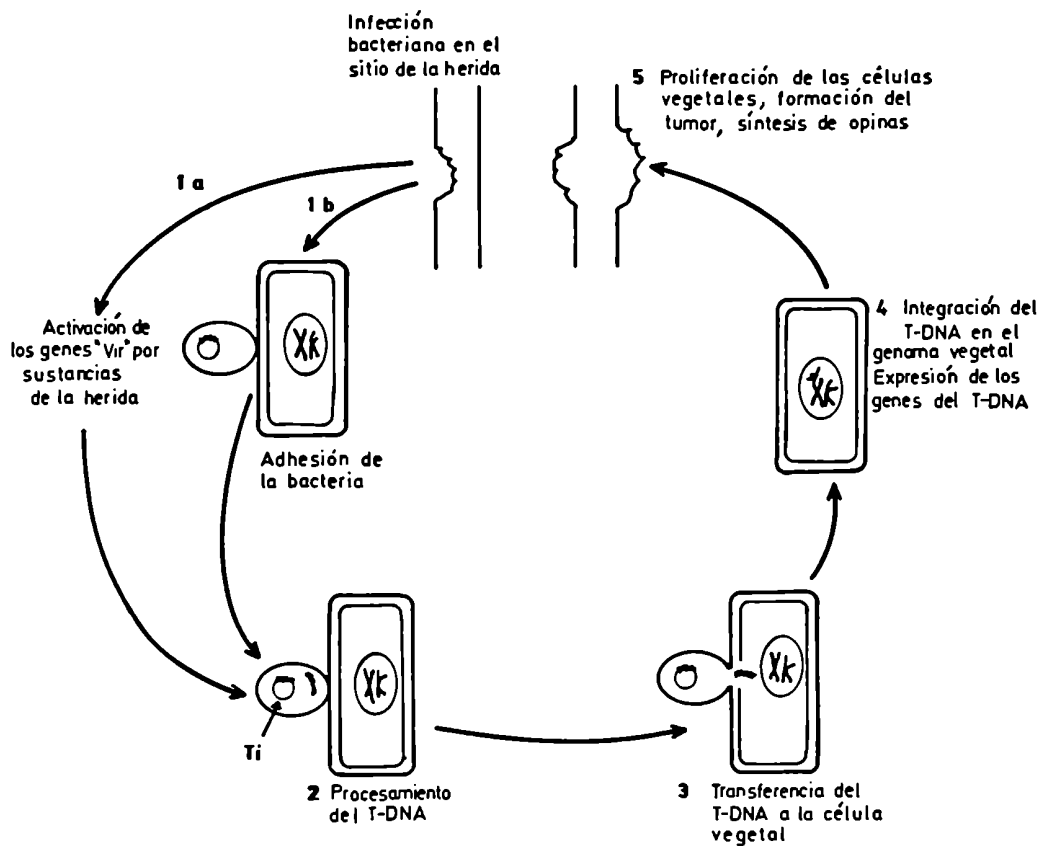


Figura 4) DESARROLLO DEL PROCESO TUMORIGENICO DE *A. tumefaciens*.

Adhesión de la bacteria a la célula vegetal: La bacteria se adhiere polarmente a la célula vegetal. Este paso es fundamental para el desarrollo del proceso infeccioso. Para esta etapa se piensa que son necesarios receptores tanto en la célula vegetal como en la bacteria. Con respecto a la parte vegetal, se sabe que existe un número limitado de receptores. Debido a que estos receptores son sensibles a proteasas se cree que son de naturaleza proteica^(53,99). Después de producida la herida existe una "ventana de tiempo"^(9,10), durante la cual las células son competentes para la infección. No se conoce la identidad del posible receptor bacteriano. Sin embargo se describieron cuatro loci bacterianos involucrados en la adhesión, que son:

chvA y *chvB* (por *ch*romosomal *vir*ulence): Las mutantes en estos loci son incapaces de adherirse a células vegetales⁽³⁴⁾. Mientras que las mutantes *ChvB* son inmóviles⁽³⁴⁾ y no producen glucano β (1-2)⁽¹⁰⁷⁾, las mutantes *ChvA* producen este polisacárido no sustituido que no es secretado⁽⁶⁸⁾. Una proteína de 235 kDa (*pi235*) que actúa como intermediaria en la

síntesis de este polisacárido esta ausente en las mutantes ChvB⁽¹⁶¹⁾, pero está presente, aún en mayor cantidad que en la cepa salvaje, en las mutantes ChvA⁽⁶⁸⁾. La secuencia del locus *chvA* muestra un solo marco de lectura abierta, que tiene homología con la hemolisina B y otras proteínas que unen ATP⁽¹⁴⁾.

exoC (pscA): Se aislaron mutantes en este locus usando como criterio la ausencia de un exopolisacárido ácido que se une a un fluoróforo (Calcofluor)⁽¹³⁻¹³⁷⁾. Estas mutantes en particular no sólo carecen del exopolisacárido, sino también del glucano β (1-2), y además son inmóviles. Por otra parte son avirulentas debido a que están afectadas en la adhesión a la célula de la planta. Otras mutantes Exo⁻ que poseen el glucano β (1-2) son virulentas. Estudios realizados en el laboratorio demostraron que las mutantes ExoC carecen de la enzima fosfoglucomutasa necesaria para la síntesis de UDPGlc⁽¹⁴⁵⁾.

Estos tres loci son los más estudiados, y cada uno de ellos constituye una unidad transcripcional.

Un cuarto locus que afecta la adhesión a la planta fue localizado en un fragmento de DNA EcoRI de 12 kb, de origen cromosomal. Todas las mutantes aisladas resultaron ser avirulentas, y se encontró que carecían de proteínas, presuntamente periplásmicas, de 33, 34, y 38 kDa⁽⁹⁰⁾.

Un aspecto que despertó mucho interés desde los primeros estudios con *Agrobacterium* fue la necesidad de una herida para que se produzca la infección. Eso se debe a que en los exudados de la herida están presentes compuestos que actúan induciendo la expresión de los loci *vir* (v.g. acetosiringona)^(127,130). Los niveles de esta molécula señal serían sentidos por el producto del gen *virA*, el cual activaría el producto del gen *virG*. Este último activaría la transcripción del resto de los loci *vir*^(112,131,132,154). Existe también un locus cromosomal (*ros*)^(15,16) que actuaría como regulador negativo de la expresión de *virC* y *virD*, ya que mutaciones en el *ros* dan lugar a la expresión constitutiva de los locus *virC* y *virD*.

Procesamiento y transferencia del T-DNA: El mecanismo por el cual se lleva a cabo este proceso no está aclarado totalmente. Existen evidencias de que por la acción de dos productos provenientes del locus *virD* se libera del pTi un T-DNA lineal de simple cadena (ssT-DNA); para que esto ocurra se requiere una secuencia específica ubicada en los extremos del T-DNA. Se propuso la formación de un complejo covalente entre los productos del locus *virD* y el ssT-DNA, y la producción de nuevas cadenas de ss T-DNA⁽⁶⁰⁾ que finalmente se transferirían a la célula vegetal por acción de los productos del locus *virB*. El sitio de acción de los productos del gen *virE* es extracelular, y se piensa que también jugarían algún papel en la transferencia del ss T-DNA (Para una revisión ver Ref. 5).

Integración del T-DNA: Esta es la parte del proceso menos conocida. Se sabe que se integra al cromosoma nuclear, aunque no se conoce la existencia de sitios de integración específicos. El proceso de integración estaría mediado por proteínas de la célula vegetal⁽⁵⁾.

Respuesta a la expresión del T-DNA: Las células transformadas crecen descontroladamente como consecuencia de la presencia de las hormonas vegetales cuya síntesis está codificada en el TR-DNA, resultando en un tumor⁽¹⁵²⁾. Cultivos de estos tumores crecen en forma autónoma sin el agregado de hormonas. Las agrobacterias utilizan las opinas liberadas por las células vegetales transformadas como fuente de Carbono y Nitrógeno, y aparentemente en respuesta a ellas, transfieren conjugativamente el pTi a otras células de *A. tumefaciens*.

Simbiosis *Rhizobium*-planta.

Bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Azorhizobium* (rizobios) son capaces de inducir en raíz o tallos y ocupar estructuras denominadas nódulos (Fig. 5). Dentro de los nódulos los rizobios se diferencian a bacteroides y expresan los genes de la nitrogenasa. El N_2 se reduce a NH_3 , se metaboliza y es transportado a la planta. El rizobio recibe fotosintatos de la planta. De esta manera se establece una simbiosis entre la planta "hospedadora" y el rizobio "hospedante" o "microsimbionte". Si bien los estudios acerca de esta simbiosis comienzan sistemáticamente durante el siglo pasado, cuando se describen los efectos de la nodulación, e incluso se observa el proceso infectivo (Fig. 6), previamente ya se habían observado nódulos en algunas especies^(59,150).

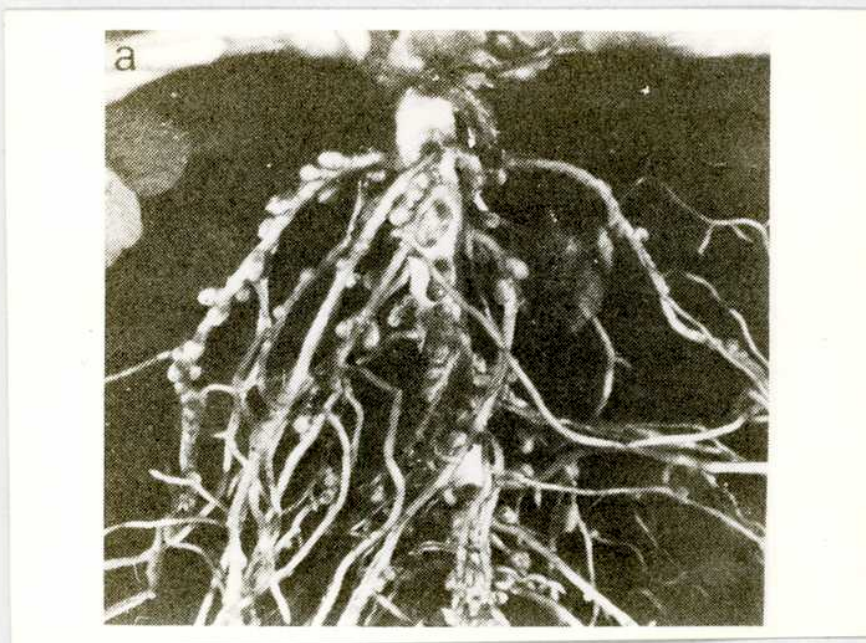


Figura 5) NODULOS FORMADOS POR *R. Trifolii* EN *Trifolium subterraneum*.

Esta simbiosis es bastante específica, ya que cada leguminosa puede ser nodulada por una sola especie de rizobio, y viceversa (Tabla V)⁽¹⁰⁶⁾.

TABLA V

Bacteria	Planta	Flavonoide inductor
<i>R. meliloti</i>	alfalfa	Luteolina ⁽¹⁰⁴⁾ .
<i>R. trifolii</i>	trébol	7-4' hidroxiflavona ⁽¹⁰⁸⁾ .
<i>R. leguminosarum</i>	arvejas	Apigenina-7- <i>o</i> -glucósido ⁽¹⁵⁶⁾ .
<i>B. lupini</i>	lupin	No se conoce.
<i>B. japonicum</i>	soja	Diazdeína, cumestrol ⁽⁷⁹⁾ .

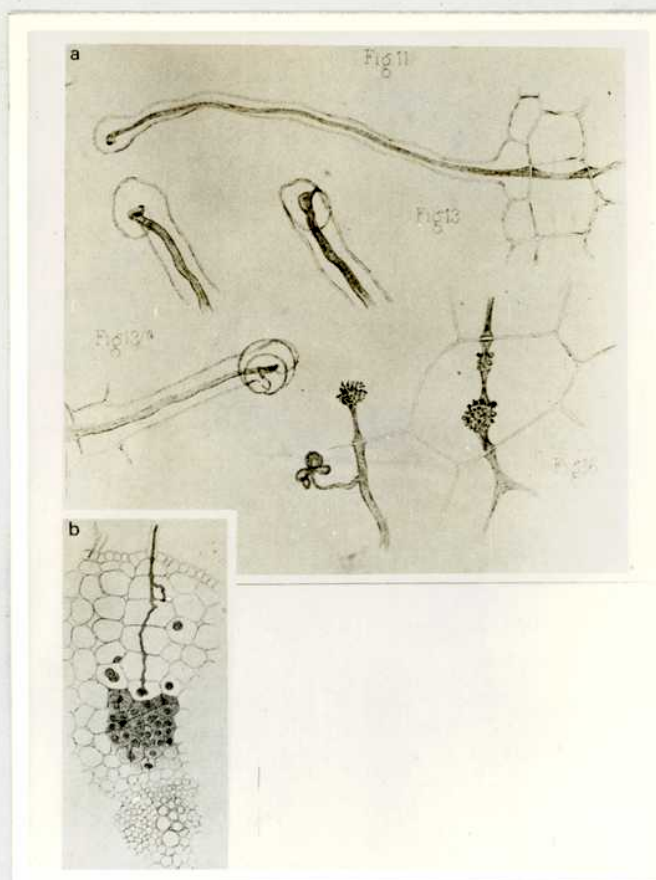


Figura 6) ESQUEMAS DEL PROCESO INFECTIVO REALIZADOS EN EL SIGLO XIX

Los rizobios presentes en la rizosfera (Fig. 7-1) se adhieren polarmente a la superficie de los pelos radiculares de las leguminosas induciendo el crecimiento de la punta de los mismos que va girando, produciendo en primer término un rulo (Fig. 7-2), y luego una estructura conocida como báculo de pastor. Para iniciar esta interacción, los rizobios han evolucionado para utilizar compuestos flavonoides liberados a la rizosfera por las plantas. Cada especie de *Rhizobium* utiliza el flavonoide producido por el hospedador específico. Estos compuestos (Tabla V) actúan como reguladores positivos de los genes bacterianos de la nodulación (genes *nod*). La bacteria queda atrapada dentro del báculo de pastor siendo en este punto donde el rizobio comienza a penetrar en la célula del pelo radicular. La bacteria comienza a dividirse y a viajar a través de la célula vegetal, siguiendo al núcleo. No existe contacto entre el rizobio y el citoplasma de la célula vegetal, ya que se forma una pared que contiene las bacterias constituyendo el hilo de infección (Fig. 7-3). Este hilo avanza hasta las células corticales donde se ramifica. Finalmente se encuentra con un foco de células corticales en división, y se libera dentro de ellas envuelto en una membrana de origen vegetal⁽¹¹¹⁾. La bacteria continúa creciendo, hasta diferenciarse a bacteroide que es capaz de reducir el N_2 ⁽¹¹⁴⁾ (Fig. 7-4). Se cree que la planta crea un ambiente adecuado que permite la desrepresión de los genes de la dinitrogenasa⁽¹¹³⁾. Además la planta es capaz de regular el crecimiento del microsimbionte regulando la disponibilidad de O_2 y nutrientes, previniendo la actividad parasitaria.

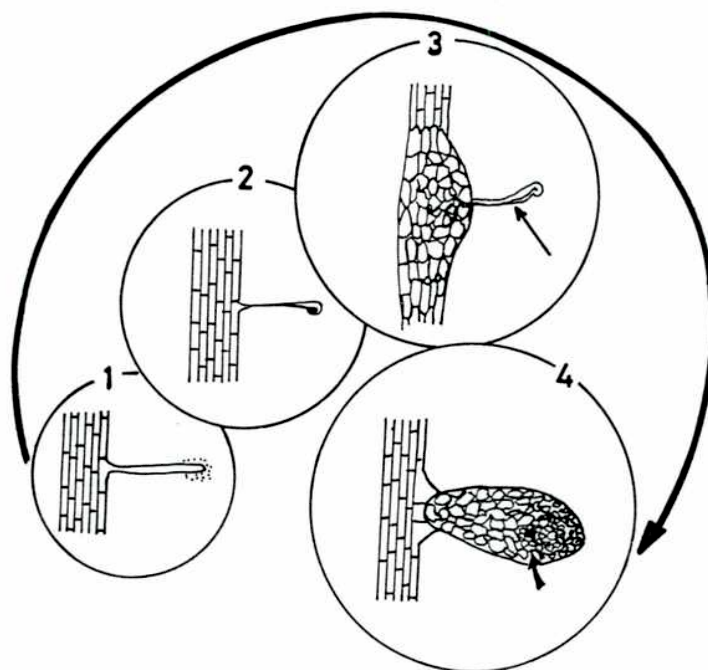


Figura 7) DESARROLLO DE LA FORMACION E INVASION DE UN NODULO.

- 1) Colonización y adhesión del rizobio al pelo radicular.
- 2) Enrullamiento y formación del báculo de pastor.
- 3) Crecimiento del hilo de infección (flecha).
- 4) Nódulo maduro. La flecha indica las células que contienen bacteroides.

Los aspectos más estudiados del proceso infeccioso son:

Reconocimiento: Dada la especificidad entre hospedador y microsimbionte se supone que debe existir algún proceso de reconocimiento específico entre ambos. En principio este reconocimiento debería ocurrir en la primera etapa. Se ha estudiado mucho la especificidad en la adherencia del rizobio a la raíz. La teoría más estudiada postula la existencia de lectinas vegetales, que reconocerían determinantes tanto de la planta como de la bacteria y formarían un puente entre ambos permitiendo la adhesión. Existen evidencias a favor y en contra de esta teoría. Por ejemplo, la primera lectina descrita fue de soja y se postuló que se unía específicamente a cepas homólogas (*B. japonicum*)⁽⁷⁾, pero posteriormente se encontró que también podía unirse a cepas heterólogas⁽⁴⁾. De trébol se aisló otra lectina llamada trifolina A⁽²⁰⁾. Esta proteína se une específicamente al lipopolisacárido y al polisacárido capsular de *R. trifolii*^(18,19), y se la encuentra en concentraciones mayores en la punta de los pelos radiculares en crecimiento⁽²⁰⁾.

Recientemente se produjeron raíces transgénicas⁽²⁸⁾ de trébol que expresaban el gen de una lectina de arveja caracterizada previamente^(12,27,51,74,75). Estas raíces formaron nódulos con el microsimbionte homólogo para la lectina (*R. trifolii*). Cuando estas raíces

transgénicas se infectaron con *R. leguminosarum* (homólogo para la lectina, pero heterólogo para la planta receptora) se formaron pseudonódulos⁽²⁸⁾. Las raíces salvajes de trébol no dan ninguna respuesta a *R. leguminosarum*. Este experimento apoya la hipótesis de la lectina, pero también indica que existen otros factores requeridos para la especificidad.

En el caso de alfalfa se describió una aglutinina que unía a *R. meliloti*⁽¹⁰³⁾, a esta aglutinina no se le puede llamar lectina ya que no se encontraron aún azúcares que inhiban la interacción. Estudios posteriores demostraron que esa aglutinación era inespecífica, y era debida a efectos electrostáticos⁽⁸⁴⁾.

El modelo más aceptado para esta primera etapa de reconocimiento es el que proponen Halverson y Stacey⁽⁵⁷⁾, y consiste en un contacto al azar entre la bacteria y la planta, luego del cual seguiría un fenómeno de adhesión específica reversible. Finalmente se sintetizarían "adhesinas" extracelulares ("pili" o microfibrillas de celulosa) que harían irreversible la unión.

Organogénesis del nódulo.

Los rizobios son capaces de inducir la división de las células de la raíz a distancia⁽¹⁴³⁾. Dicha información está contenida en el pSym⁽¹⁴⁴⁾. Para el comienzo del desarrollo del nódulo, no es necesaria la deformación total del pelo radicular, ya que mutantes que producen enrollado parcial (*exo* y *ndv*)^(39,45, esta tesis), inducen el comienzo de la organogénesis.

R. leguminosarum cultivado en presencia de exudados vegetales, produce un factor que altera la morfología de la raíz⁽¹⁴⁶⁾. El efecto observado se lo denominó Tsr (thick short root). La producción del factor tsr, depende de los genes *nodABC*. Mutantes en estos genes no inducen la división celular en la raíz, ni producen deformación del pelo radicular. Esto sugiere que existe algún tipo de relación entre ambos eventos.

Crecimiento de los hilos de infección:

Luego de la formación del báculo de pastor la bacteria atrapada comienza a invadir la célula del pelo radicular. La invasión comienza con la formación de la mancha hialina ("bright spot"). En este punto comienza a formarse el hilo de infección⁽⁸⁷⁾. Se ha descrito una mutante de *R. trifolii* que no puede penetrar la pared vegetal. Se observó en el sitio donde la mutante tomó contacto con la raíz, estructuras electrodensas probablemente debidas a una respuesta defensiva de la planta⁽³²⁾. En el caso de *R. meliloti* y alfalfa, los genes *nodE* y *nodF* son necesarios para la formación del hilo de infección⁽²²⁾.

No se conoce la estructura del material extrabacteriano dentro del hilo de infección. A este respecto, es interesante señalar que recientemente se aisló un exopolisacárido de *R. meliloti* que no se une al calcofluor, y es sintetizado por una mutante (*expR101*)⁽¹⁰⁹⁾. La mutación se localiza en el cromosoma. Otras características de este polisacárido se discutirán más adelante.

Tipos de nódulos:

Desde el punto de vista morfológico (Fig. 8), los nódulos pueden ser de dos tipos: determinados o indeterminados⁽¹¹³⁾.

Las leguminosas de climas templados (alfalfa, trébol) desarrollan nódulos indeterminados. Estos tienen las siguientes características: a) poseen un meristema definido durante el desarrollo del nódulo, b) Poseen un sistema vascular abierto que conecta el sistema vascular de la raíz con el del

meristema del nódulo, c) Las células infectadas presentan vacuolas, d) los compuestos nitrogenados que se transfieren a la planta son asparagina y glutamina, y e) los bacteroides son elongados. Generalmente estos nódulos son cilíndricos y tienden a ser infectados por el género *Rhizobium*.

Las leguminosas de climas tropicales (soja, lupin) forman nódulos determinados. Las principales diferencias con los nódulos indeterminados son que mientras estos últimos provienen de la división de células corticales de capas más internas y presentan actividad meristemática durante todo el desarrollo, los nódulos determinados provienen de la división de células ubicadas justo debajo de la epidermis, la actividad meristemática no es persistente, y está limitada al período temprano de desarrollo del nódulo. Posteriormente las células originadas por esas divisiones crecen en tamaño. Este tipo de nódulos tienden a ser infectados por *Bradyrhizobium*.

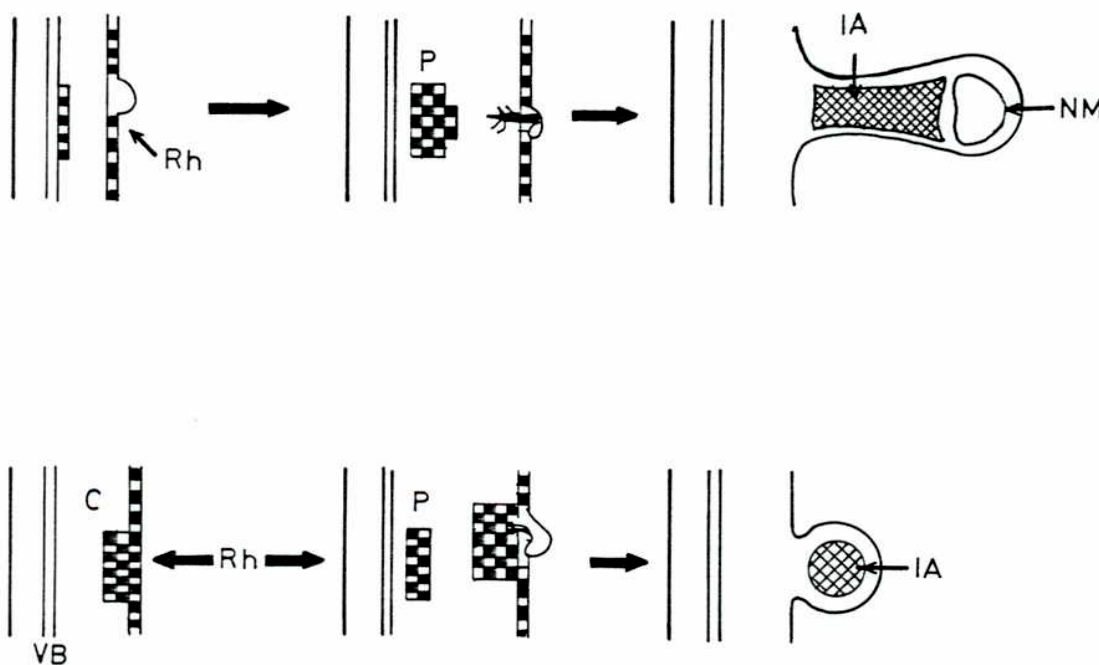


Figura 8) FORMACION DE NODULOS DETERMINADOS E INDETERMINADOS.

Panel Superior: Nódulo indeterminado.

Panel Inferior: Nódulo determinado.

Rh: rizobio, P: divisiones celulares, IA, Area Infectada y region de fijación de N_2 , NM: meristema del nódulo, VB: paquete vascular, C: corteza.

Estructura y organización de los genes relacionados con la nodulación.

El estudio de los genes que intervienen en la nodulación se realizó obteniendo mutantes afectadas en este proceso. Posteriormente se las complementó con DNA de la cepa salvaje, y se identificaron los loci y genes involucrados.

En principio se pueden obtener mutantes afectadas en varias etapas relacionadas con la nodulación (Tabla VI)⁽¹⁴⁹⁾. En la práctica se pueden rastrear mutantes solo en aquellos fenotipos sencillos. Las mutantes obtenidas son de tres tipos: de nodulación (Nod⁻), de fijación del N₂ (fix)⁽⁷⁷⁾, y aquellas mutantes que inducen la formación del nódulo pero no lo colonizan, dando nódulos vacíos o pseudonódulos (Inf⁻)

TABLA VI
Fenotipos Posibles en los Procesos de Infección y Nodulación⁽¹⁴⁹⁾

Estadio	Abreviatura
I. Preinfección	
1. Colonización de raíz	Roc
2. Adhesión a la raíz	Roa
3. Ramificación del pelo	Hab
4. Enrulado del pelo	Hac
II. Infección	
5. Hilos de infección	Inf
6. Iniciación del nódulo	Noi
7. Liberación de bacterias	Bar
8. Desarrollo del bacteroide	Bad
III. Función nodular	
9. Fijación de N ₂	Nif
10. Funciones del nódulo	Cof
11. Persistencia del nódulo	Nop

Mutantes Nod: Están afectadas en los genes *nod*. Estos genes se localizan en un plásmido pSym. Son de dos tipos: comunes a todas las especies de *Rhizobium* (*nodABCD*), y específicos del rango de hospedador (*nodEFGH*). Las propiedades de sus productos y el fenotipo infeccioso se muestran en la Tabla VII. En la Fig. 8 se muestra su organización.

De estos genes sólo el *nodD* se expresa constitutivamente, los restantes sólo se transcriben durante el proceso de infección, y como resultado de la presencia de flavonoides o isoflavonoides liberados por la planta (Tabla V). También se ha observado una secuencia consenso de 26-28 bp llamada "nod-box" frente a las unidades transcripcionales no constitutivas^(116,120,126,156). Se piensa que el producto del gen *nodD* forma parte de un mecanismo que sensa la presencia del flavonoide y frente a niveles adecuados promueve la transcripción de los genes regulados por la nod-box. A este respecto existe evidencia de que el producto del gen *nodD* se une a esa secuencia consenso⁽⁴⁶⁾.

Mutantes Fix: Están afectadas en los genes que se requieren para la fijación del N₂ (genes *nif*). Estos genes están localizados en el mismo plásmido pSym que los genes *nod*.

Tabla VII.
FENOTIPO DE LAS MUTANTES

GEN	COMENTARIO	FENOTIPO DE LAS MUTANTES			Refs.
<i>nodA</i>	Citoplásmico	<i>R. leguminosarum</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>R. meliloti</i>	(78,115,118,120)
<i>nodB</i>		Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻	(78,115,120)
<i>nodC</i>	Unido a membrana	Hac ⁻	Hac ⁻	Hac ⁻	(71,78,115)
<i>nodD</i>		Regulatorio	Hac ⁻	Hac ⁻	retraso
<i>nodE</i>		retraso	retraso Nod ⁺ A)	retraso	(21,66,121)
<i>nodF</i>	Homología con "acyl carrier protein"		pea retraso	retraso	(21,66,120,121)
<i>nodG</i>	Homología con ribitol deshidrogenasa	NI	NI	retraso	(120,121)
<i>nodH</i>		NI	NI	Hac ⁻	(120,121)
<i>nodI</i>	Asociado a membrana; homología con componentes de sistemas de transporte	retraso	NI	NI	(43)
<i>nodJ</i>	Probablemente unido a membrana	retraso	NI	NI	(43)
<i>nodL</i>		?	NI	NI	(36)
<i>nodM</i>	Homología con amidofosforibosil transferasa		NI	NI	(36)
<i>nodX</i>	Probablemente unido a membrana ^{B)} .		C)		(54)

NI: gen no identificado. ?: no se aislaron mutantes, Hac⁻: no produce enrulamiento ni nódulos, retraso: atraso en la aparición de nódulos y reducción en su número.

A) Nod⁺ en arveja.

B) confiere nodulación a ardejas de Afghanistan.

C) Nod⁻ en ardejas de Afghanistan.

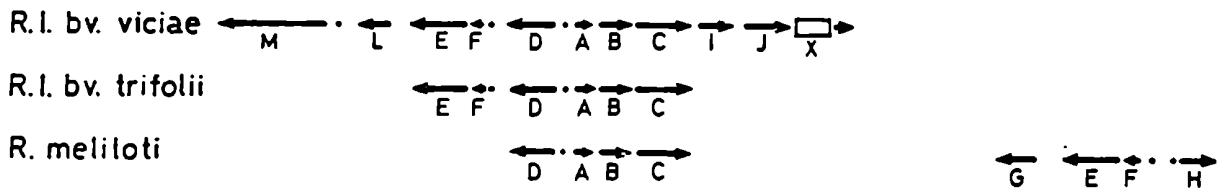


Figura 9) ORGANIZACION DE LOS GENES *nod* EN VARIAS ESPECIES DE *Rhizobium*.

Los genes *nodEFGH* se denominan también *hsnBACD* ^(60,78). Los círculos indican la presencia de la "nod-box".

Mutantes Inf: Estas mutantes producen nódulos no colonizados. Este tipo de mutantes no se aislaron por búsqueda para ese fenotipo, sino por alteraciones en la cantidad de exopolisacárido producido, o mutagénesis dirigida a loci homólogos a los *chvA* y *chvB* de *A. tumefaciens*. En esta sección se describirán algunas características de las mutantes obtenidas en *R. meliloti*.

Mutantes Exo: Para el aislamiento de estas mutantes se aprovechó la capacidad del exopolisacárido ácido de unirse a un fluoróforo llamado Calcofluor^(81,82). Las colonias de mutantes no productoras de exopolisacárido no fluorescen, y las sobreproductoras producen mayor fluorescencia que la cepa salvaje⁽³³⁾. Las mutantes que carecen de este polisacárido se clasificaron en varios grupos de complementación (Tabla VIII). Salvo algunas excepciones, mutaciones en estos loci dan lugar a pseudonódulos. Salvo los loci *exoC* y *exoD* que son cromosomales, el resto están agrupados en un plásmido (pSymRmeSU47B)⁽⁴⁴⁾ que es distinto al pSym que lleva los genes *nod*.

Las mutantes sobreproductoras de exopolisacárido aisladas (Tabla VIII) pertenecen a los grupos R y S⁽³³⁾. En cepas salvajes la producción de este polisacárido se incrementa cuando las bacterias se cultivan en medios pobres en Nitrógeno mientras que en estas mutantes la sobreproducción es constitutiva, pero sólo las mutantes ExoS aumentan la producción en medios pobres⁽³³⁾.

Tabla VIII

GRUPO	UBICACION	FENOTIPO NODULATORIO	EPS	GLUCANO β (1-2)	LPS
A	Plásmido ^a	pseudonódulos	-	+	+
B	"	"	-	+	+ ^e
C	Cromosoma	"	-	-	-
D	"	"	+ ^c	+	+
F	Plásmido	"	-	+	+
G	"	nódulos ^b	+/-	+	N.D.
H	"	pseudonódulos	+ ^d	+	+
J	"	nódulos ^b	+/-	+	N.D.
K	"	"	+/-	+	N.D.
L	"	pseudonódulos	-	N.D.	N.D.
M	"	"	-	+	N.D.
N	"	nódulos	+/-	+	N.D.
P	"	pseudonódulos	+/-	+	N.D.
Q	+	+	-	N.D.	N.D.
R	N.D.	pseudonódulos	++	N.D.	N.D.
S	N.D.	N.D.	++	N.D.	N.D.

^a Se refiere al pSym RmeSU47B.

^b Son menos eficientes.

^c El exopolisacárido es anormal en cuanto a distribución de pesos moleculares.

^d El exopolisacárido es anormal debido a que no posee sustituyentes succinilo.

^e Posee propiedades electroforéticas anómalas

LPS: Lipopolisacárido.

EPS: Exopolisacárido.

Mutantes Ndy: Utilizando como sondas fragmentos de DNA de los loci *chvA* o *chvB*⁽³⁴⁾ se encontró homología en varias especies de *Rhizobium*⁽³⁹⁾. Los locus homólogos de *R. meliloti*

se clonaron y se prepararon mutantes dirigidas en cada una de estas regiones. Estas mutantes indujeron la formación de nódulos vacíos en alfalfa. Por esta razón estos loci se llamaron *ndv* (por *nodule development*) *A* y *B* (homólogos a los loci *chvA* y *chvB* de *A. tumefaciens* respectivamente)⁽³⁹⁾. Las mutantes *NdvA* no sintetizan glucano β (1-2), y sobreproducen la proteína de 235 KDa intermediaria en la biosíntesis de este polisacárido. El locus *ndvA* codifica para una proteína homóloga a la Hemolisina B⁽¹³⁴⁾.

Factores del hospedador involucrados en la nodulación.

Las plantas hospedadoras poseen un mecanismo de regulación del número de nódulos formados^(101,105). Los mecanismos regulatorios evitan la iniciación de nuevas infecciones, y producen la interrupción de los procesos infectivos iniciados.

Se ha identificado un grupo de aproximadamente 20 proteínas que parecen ser específicas del nódulo, se las llamó nodulinas^(47,55,56,80). Algunas de esas proteínas están clonadas⁽²³⁾. La más relevante es la leghemoglobina, una hemoproteína que le da el color rosado característico al nódulo, y cuya función es mantener baja la pO_2 de manera tal que no inactive la nitrogenasa que es muy sensible al O_2 .

Se ha encontrado que mutantes *Exo* y *Ndv* sólo estimulan la aparición de dos nodulinas. Estas son la *NMS30* y la *ENOD2*⁽²⁹⁾. Esto último sugiere que para la expresión del resto de las nodulinas es necesario un desarrollo más avanzado del nódulo.

En la Fig. 10 se muestran las interacciones (algunas confirmadas y otras posibles) entre hospedador y hospedante para establecer un nódulo activo.

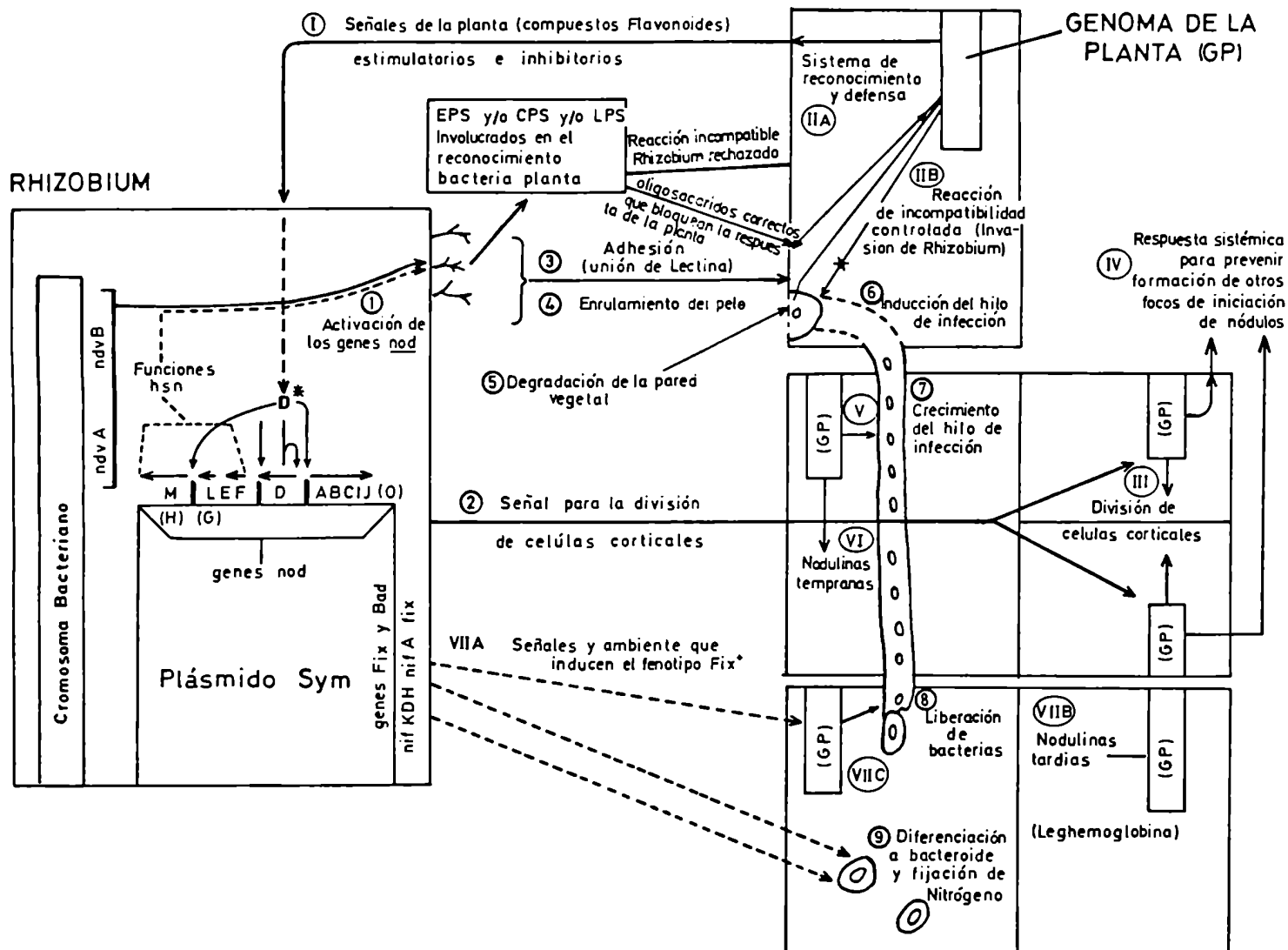


Figura 10) INTERACCIONES ENTRE EL RIZOBIO Y LA PLANTA.

Polisacáridos producidos por *Rhizobium* y *Agrobacterium*.

Dentro de los polisacáridos producidos por los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, los más estudiados son el exopolisacárido ácido y el glucano β (1-2).

El exopolisacárido ácido constituye la capa más externa de la célula, y es el responsable de la mucosidad observada en estas bacterias. Su síntesis depende de la fase de crecimiento del cultivo. Están constituidos por "unidades repetitivas" que contienen distintos azúcares. En un primer paso las unidades repetitivas se sintetizan unidas a un lípido intermediario y luego polimerizan. De acuerdo a los componentes se pueden clasificar en dos grupos, I: están constituidos por D-glucosa, D-galactosa, y ácido pirúvico (7:1:1), y están presentes en *R. meliloti* y *A. tumefaciens*⁽¹⁵⁷⁾; y II: compuestos por D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, y ácido pirúvico (5:1:2:2), y están presentes en *R. leguminosarum*, *trifolii*, y *phaseoli*^(110,158).

La unidad repetitiva del exopolisacárido clase I se muestra en la Figura 11. Su síntesis se realiza utilizando como intermediario poliprenil fosfato^(133,139,140) (Fig. 11). También se determinó que los sustituyentes acetilos y piruvilos se incorporan antes de la polimerización. No fue posible realizar in vitro este proceso. Se describió también que este polisacárido está succinilado. Este polisacárido es necesario para la invasión del nódulo, ya que mutantes que carecen del mismo (*Exo*⁻) forman pseudonódulos⁽⁸³⁾.

Recientemente se informó que una cepa de *R. meliloti* 1021 mutada en el locus cromosomal *expR101* produce un exopolisacárido que consiste en un dímero de glucosa y galactosa⁽¹⁰⁹⁾, y presenta uniones α (1-3) y β (1-3). La glucosa está sustituida en C6 con un grupo acetilo, y la galactosa en C4 y C6 con un grupo piruvilo. Para su síntesis se requieren el locus *exoB* y los loci *expA-E* ubicados en el plásmido pRmeSU47b, estos últimos loci no están ligados al grupo *exo*⁽¹⁰⁹⁾.

Glucanos β (1-2): Estos polisacáridos se encuentran únicamente en la familia *Rhizobiaceae*^(1,63). Son polímeros de glucosa con uniones β (1-2), no poseen extremo reductor porque son cíclicos⁽²⁴⁾, y su grado de polimerización varía entre 17 y 33^(3,61,76). Pueden aislarse tanto del medio de cultivo como de las células^(1,63,95). Recientemente se describió que pueden estar sustituidos en distintos grados con *sn*-1-glicerolfosfato y succinilos^(2,64,94,96).

La acumulación del glucano β (1-2) está relacionada con la osmolaridad del medio^(95,159), por lo que se cree que está involucrado en la osmorregulación.

La síntesis del glucano β (1-2) no ha sido aclarada totalmente. El único componente identificado es una proteína de 235 KDa (*pi235*)^(161,162) que actúa como intermediaria, y está presente en membranas internas de *A. tumefaciens* y *R. meliloti*. Esta proteína no se encuentra en las mutantes *ChvB*⁽¹⁶¹⁾.

La síntesis in vitro del glucano β (1-2) se realiza utilizando membranas internas de *A. tumefaciens* o *R. meliloti* como enzima y UDPGlc como dador de glucosa, se requiere la presencia de un catión divalente (Mg^{++} o Mn^{++})⁽¹⁶²⁾. La síntesis puede dividirse en dos etapas (Fig. 12)⁽¹⁵⁹⁾. La primera consiste en la elongación de glucano β (1-2) lineal sobre la *pi235*, y es dependiente del catión divalente. En la segunda etapa se produce la ciclación y liberación de la proteína del glucano β (1-2) cíclico, dejando disponible la *pi235* para la síntesis de otra molécula del polisacárido.

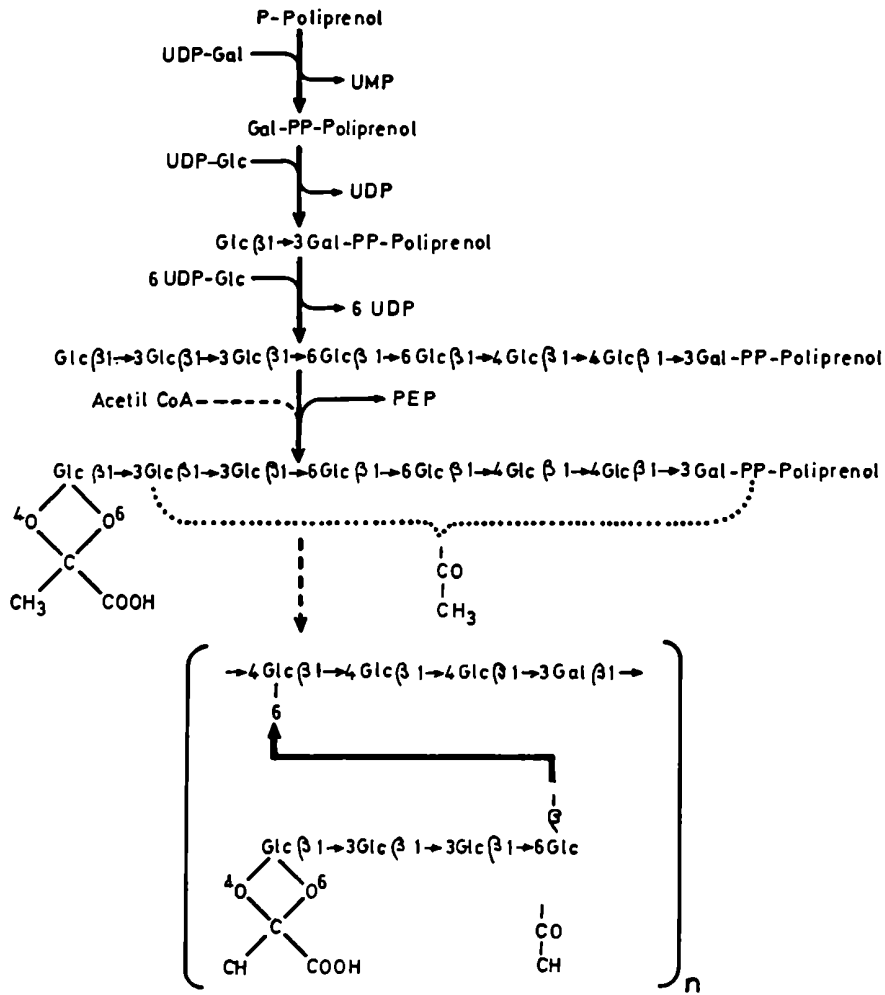
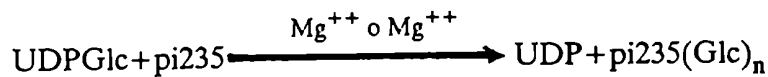


Figura 11) SINTESIS Y ESTRUCTURA DE LA UNIDAD REPETITIVA DEL EXOPOLISACARIDO TIPO I.

1) ELONGACION:



2) CICLACION Y LIBERACION:



Figura 12) SINTESIS DEL GLUCANO $\beta(1-2)$.

OBJETIVOS

La presencia de determinados polisacáridos producidos por *Agrobacterium* y *Rhizobium* son necesario para la interacción con la planta.

Debido a que las mutantes ChvB no sintetizan glucano β (1-2) y carecen de la proteína intermediaria de 235 KDa se realizaron estudios con el fin de determinar el producto del locus *chvB*, y su relación con la síntesis de este polisacárido.

Debido al tamaño inusual de la proteína intermediaria, se realizaron estudios con el objeto de determinar si fragmentos de menores son activos en la síntesis del glucano β (1-2).

Se conoce también que el grado de polimerización es característico de cada especie, pero se desconoce si tiene influencia en la interacción con la planta. Por otra parte la única proteína conocida en la síntesis del glucano β (1-2) es la proteína intermediaria de 235 KDa. Se realizaron experimentos para determinar si esta proteína esta relacionada con el grado de polimerización del glucano, y si el grado de polimerización es importante para la interacción con la planta.

Por otra parte se estudiaron las características bioquímicas de una mutante de *R.meliloti* (GRT21s) que forma pseudonódulos en alfalfa. También se estudió el fenotipo infectivo de esta mutante, con el objeto de determinar que paso del proceso infectivo era incapaz de desarrollar. También se complemento genéticamente esta bacteria, lo que permitió a determinar su genotipo.

Se realizaron estudios de hibridización de DNA con una cepa salvaje de *R.meliloti*, utilizando como sonda DNA del locus *chvB* de *A. tumefaciens*. Con ésta técnica se intentó determinar la naturaleza de la mutación de GRT21s.

CAPITULO 1**MAPEO BIOQUIMICO DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA PROTEINA INTERMEDIARIA DE****235 KDa**

RESUMEN:

La biosíntesis del glucano β (1-2) se lleva a cabo a través de una proteína intermediaria de 235 kDa (pi235). Mutantes *chvB* de *A. tumefaciens* carecen de esta proteína y son incapaces de sintetizar glucano β (1-2). Estudios previos con mutantes *chvB* indicaron que este locus es un operón que abarca por lo menos 5 kb, y que contendría por lo menos 3 genes⁽³⁴⁾. Por esta razón no existiría lugar físico suficiente en dicho locus para codificar por la pi235. Se estudió la síntesis de novo de proteínas en una cepa salvaje de *A. tumefaciens* y una mutante *chvB*. La cepa mutante careció de la pi235. En estudios realizados con una mutante *chvB* complementada con un plásmido que contiene el locus *chvB* (pRAR205) se observó que sintetizan glucano β (1-2) a través de una proteína intermediaria de 150 kDa (pi150). Las proteínas intermediarias encontradas en cepas virulentas de *A. tumefaciens* que tenían inserciones del transposón *Tn3HoHo1* en distintos sitios "downstream" del locus *chvB* tenían pesos moleculares comprendidos entre 145 y 228 kDa, y fueron funcionales en la síntesis del glucano β (1-2). Significativamente el incremento del tamaño de la proteína intermediaria era directamente proporcional a la distancia entre el sitio de inserción del transposón con respecto al extremo 3' del locus *chvB*. La excepción la constituye la cepa ME101 que produce una proteína intermediaria de mayor peso molecular que la de la cepa salvaje. Esto es debido a que la correspondiente proteína intermediaria incompleta estaba fusionada a la β -galactosidasa. Previamente se habían descrito dos cepas virulentas de *A. tumefaciens* con inserciones de transposones dentro de la región *chvB*. Un mapeo más cuidadoso del locus *chvB* de estas cepas reveló que la localización de las inserciones era incorrecta.

Se realizaron digestiones parciales con tripsina de membranas internas de una cepa salvaje de *A. tumefaciens* en dos condiciones. La condición 1 dio lugar a polipéptidos intermediarios de menor peso molecular (200, 130 y 95 kDa) capaces de sintetizar glucano β (1-2) normal, indicando que fragmentos de la pi235 conservan la actividad enzimática. La condición 2 dio origen a tres polipéptidos de 130, 110, y <20 kDa. Las digestiones parciales con tripsina de membranas internas de cepas que producían proteínas intermediarias incompletas dieron origen a algunos fragmentos comunes con la cepa salvaje. El gen estructural de la pi235 comienza dentro del locus *chvB*, a por lo menos 3,9 kb de su extremo 3' y se extiende entre 3,5 y 4 kb "downstream" del locus. Según los datos bioquímicos quedan 1,1 kb en el extremo 5' del locus *chvB* necesarias para la virulencia y la síntesis del glucano β (1-2) pero que no codificarían para la pi235. En esta región podría estar codificada otra proteína que juegue algún papel en los procesos mencionados.

INTRODUCCION

Estudios previos habían descrito mutantes de *A. tumefaciens* que eran avirulentas, e incapaces de unirse a células vegetales⁽³⁴⁾. La región cromosomal involucrada fue llamada *chvB*. Estas mutantes carecían del glucano β (1-2)⁽¹⁰⁷⁾ debido a que no poseían la pi235⁽¹⁶¹⁾. El mapeo de la región *chvB* se realizó utilizando el cósmido pCD523 que contiene las regiones *chvB* y *chvA*⁽³⁴⁾. Se generaron distintos clones que contenían inserciones del transposón *Tn3HoHo1* en toda la región *chvB* y sus zonas flanqueantes. Estos plásmidos se introdujeron en la cepa A348, y por la técnica de rescate del marcador se obtuvieron mutantes cromosomales en la región *chvB* (Fig. 13). Así se definió que el locus *chvB* abarcaba 5 kb. Dentro de éste se encontraron dos inserciones del transposón *Tn3HoHo1* que daban lugar a las cepas virulentas ME116 y ME2 (Fig. 13). Estas inserciones sugerían la existencia de por lo menos 3 genes necesarios para la virulencia. Este hallazgo resultó sorprendente, ya que datos de complementación sugerían que las 5 kb formaban un operón y en general las inserciones de transposones interrumpen la transcripción de operones. Una ventaja del uso del transposón *Tn3HoHo1* (Fig. 14) es que produce fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*⁽¹²⁸⁾, y puede producir fusiones traduccionales con la β -galactosidasa.

En este capítulo se describe la identificación del producto de un gen de la región *chvB*. Sorpresivamente este producto resultó ser la pi235 y el gen que codifica para ésta, si bien comienza dentro de la región *chvB*, se extiende "downstream" del locus.

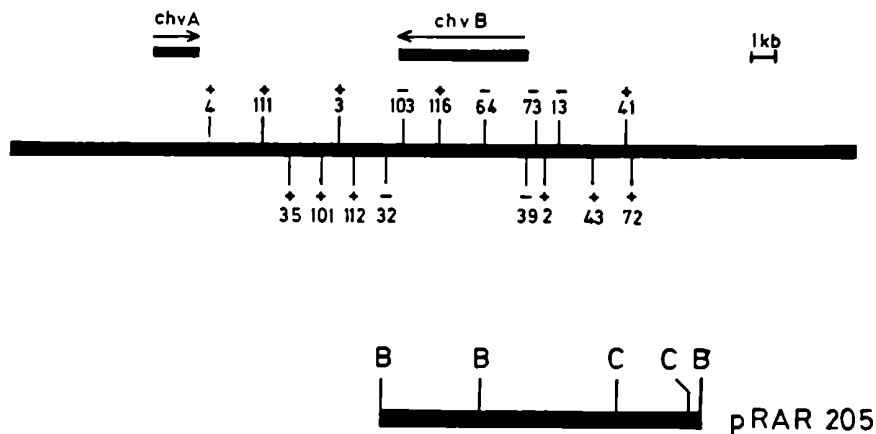


Figura 13) Mapa de las regiones *chvA* y *chvB*⁽³⁴⁾. Con las barras negras se indican los loci *chvA* y *chvB*. Las flechas indican la dirección de transcripción. Las líneas verticales indican los sitios de inserción del transposón *Tn3HoHo1*. Las líneas que están hacia arriba indican aquellas inserciones donde el gen *lacZ* quedó en el sentido de transcripción del locus *chvB*. Los signos (+) y (-) indican fenotipo virulento y avirulento respectivamente. Las líneas hacia abajo indican aquellas inserciones en las que el gen *lacZ* del transposón quedó en el sentido contrario al de la transcripción locus. En la parte inferior se muestra el mapa de restricción del fragmento de DNA cromosomal contenido en el plásmido pRAR205. B: BamHI, C: ClaI.

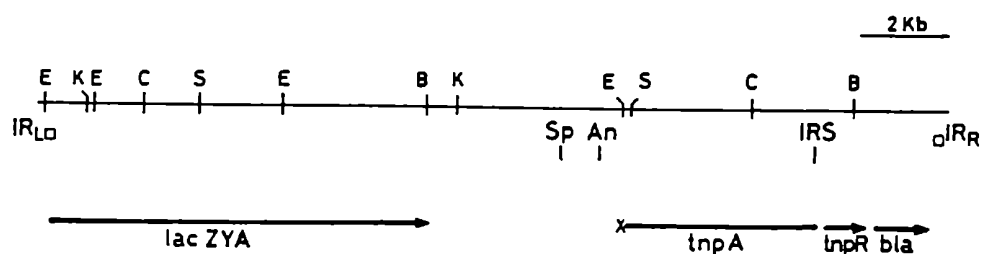


Figura 14) Mapa del transposón *Tn3HoHo1*⁽¹²⁸⁾. Estructura y organización del transposón *Tn3HoHo1*. *tnpR* resolvasa y *bla* β -lactamasa, *tnpA* transposasa. Esta última es no funcional. *lacZYA* es el operón *lac* de *E. coli*. IR_L es la "inverted repeat" izquierda, e IR_R es la derecha, IRS es el sitio de resolución interno, Sp es un sitio eucariótico de "splicing", y A es un sitio eucariótico de poliadenilación. B: BamHI, Bg: Bgl II, C: ClaI, E: Eco RI, K: Kpn I.

RESULTADOS

Síntesis de novo de proteínas en *Agrobacterium*

Las mutantes *chvB* no poseen la pi235 unida a membranas internas. Con el objeto de determinar si eran capaces de sintetizar la proteína intermediaria, se incubaron con ^{35}S -metionina células provenientes de cultivo en fase logarítmica de una cepa salvaje *A. tumefaciens* ((A-723) y una mutante *chvB* (A-1045). Las células así incubadas se lisaron y los lisados se sometieron a ultracentrifugación. Los sobrenadantes (citósol) y precipitados (membranas) obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y la radioactividad se detectó por fluorografía (Fig. 15). En el precipitado proveniente de la cepa salvaje (carril 4) se observó una proteína que comigró con los standards de pi235 producida por *A. tumefaciens* (carril 3) o *R. meliloti* (carril 6). Esta proteína estaba ausente en los sobrenadantes de ambas cepas y en el precipitado de la mutante (carriles 1, 2 y 5). Estos resultados sugirieron que la pi235 estaba ausente en la mutante, bien porque no se sintetiza, o porque se degrada rápidamente. Aunque en ningún caso se observaron proteínas de mayor tamaño que la pi235. Es importante puntualizar que en el sobrenadante de la cepa mutante, no se observó la acumulación de ningún precursor de mayor peso molecular.

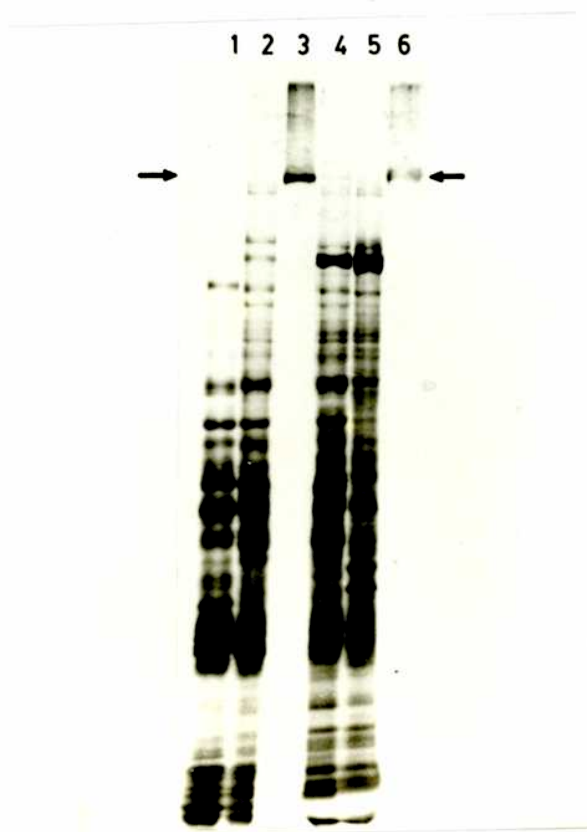


Figura 15) Síntesis de proteínas en A723 y A1045. Células de A723 y A1045 se incubaron con ^{35}S -metionina de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Se tomaron alícuotas

equivalentes a 50 Kcpm insolubles en TCA 10%, y se las sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida. La distribución de la radioactividad se visualizó mediante fluorografía.

Carriles: 1) Sobrenadante A723, 2) Sobredante A1045, 4) Precipitado A723, 5) Precipitado A1045. Los carriles 3 y 4 corresponden a standards de membranas internas de *A. tumefaciens* y *R. meliloti* respectivamente incubadas con UDP[¹⁴C]Glc.

Hallazgo de una proteína intermediaria de 150 kDa.

El fenotipo avirulento de las mutantes ChvB se complementa con el plásmido pRAR205⁽³⁴⁾. Este plásmido contiene la región *chvB* completa (5 kb). Debido a la ausencia de la *pi235* en estas mutantes, se pensó que el locus *chvB* estaría involucrado en la expresión o estabilidad de esta proteína. Se analizó la proteína intermediaria producida por una mutante ChvB (A1011) complementada con el plásmido pRAR205 (cepa SC5). Para ello membranas internas de esta cepa se incubaron en presencia de UDP[¹⁴C]Glc, y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. Sorprendentemente, luego de la tinción para proteínas (Fig. 16 A), la *pi235* estaba ausente en los carriles correspondientes a la cepa SC5. Luego de la fluorografía (Fig. 16 B), se observó que a diferencia de la cepa A723, en la cual la radioactividad estaba asociada a la *pi235*, en la cepa SC5 la marca estaba asociada a una proteína de 150 kDa. En ambos casos la radioactividad asociada a las proteínas disminuía luego de la adición de UDPGlc no radioactivo al medio de incubación, indicando que en ambas proteínas la radioactividad estaba asociada a un producto con características de intermediario.

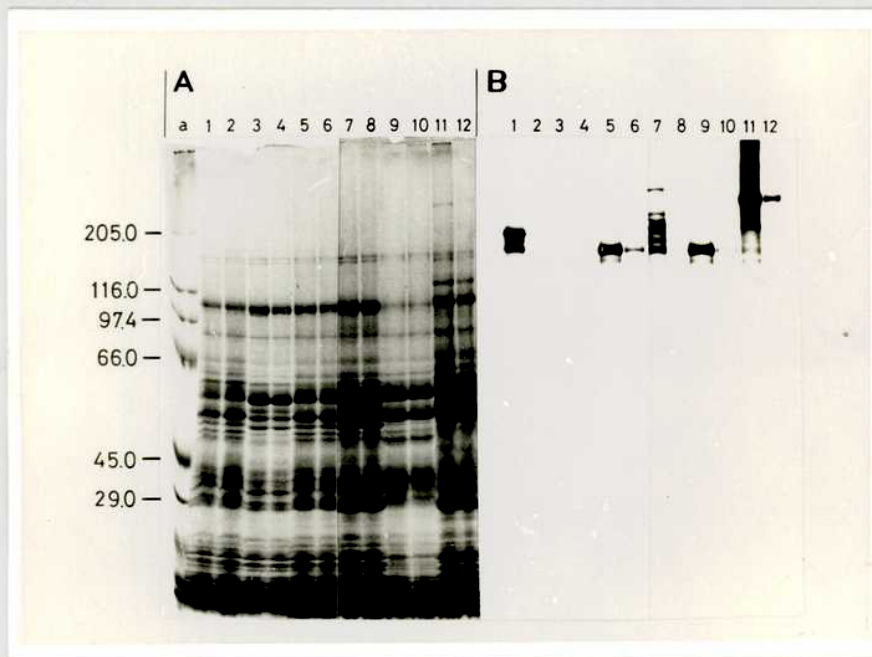


Figura 16) Proteínas presentes en membranas internas de las cepas SC5, ME103, ME32, ME101, y ME112. Las membranas internas se incubaron con UDP[¹⁴C]Glc y la fracción insoluble en TCA 10% se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. El pulso consistió en la incubación con UDP[¹⁴C]Glc durante 10 min, el "chase" consistió en agregar al medio de incubación UDPGlc no radioactivo (2 mM) luego del pulso e incubar por otros 30 min. A) Tinción con Coomassie Blue, B) Fluorografía. Los números sobre la izquierda indican el peso molecular en KDa de los standards. Carriles 1 y 2) *A. tumefaciens* ME112; 3 y 4) *A. tumefaciens*

ME103; 5 y 6) *A. tumefaciens* ME32; 7 y 8) *A. tumefaciens* ME101; 9 y 10) *A. tumefaciens* SC5; y 11 y 12) *A. tumefaciens* salvaje (A90). Los carriles pares corresponden al pulso y los impares al "chase".

Producción de glucano β (1-2) in vivo e in vitro por la cepa SC5.

Con el objeto de verificar si la pi150 presente en la cepa SC5 sintetiza glucano β (1-2) normal, se incubaron como se describe en Materiales y Métodos membranas internas de esta cepa con UDP[14 C]Glc. La fracción neutra obtenida se sometió a cromatografía líquida de alta presión, juntamente con [3 H]glucano β (1-2) producido con membranas internas de la cepa salvaje A723. La distribución de radioactividad obtenida con el material proveniente de la cepa SC5 fue la misma que la obtenida con la cepa salvaje, indicando que el polisacárido formado por la pi150 es un glucano β (1-2) indistinguible del producido por la pi235 (Fig. 17).

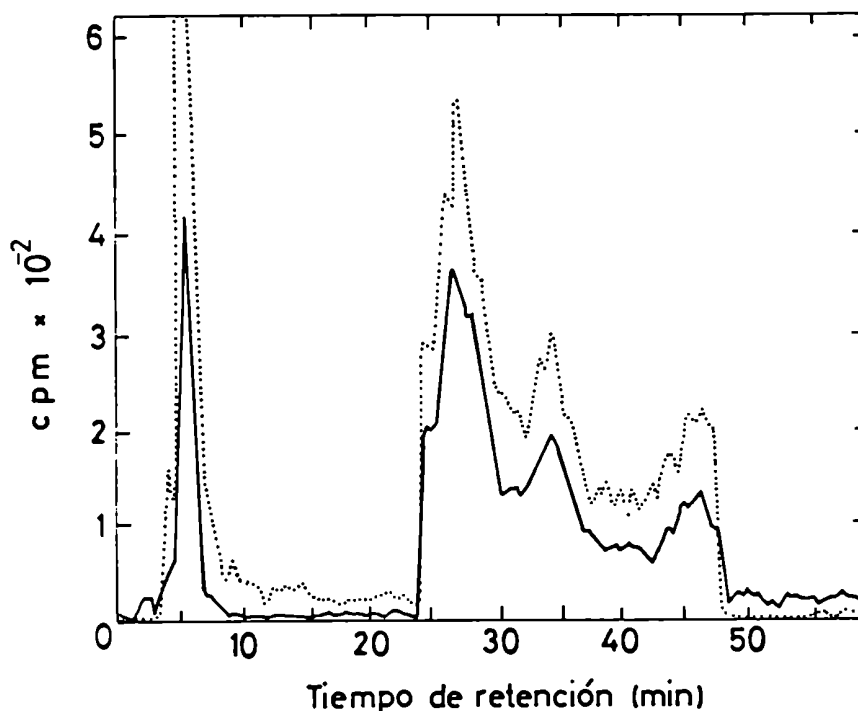


Figura 17) Polisacáridos sintetizados in vitro por membranas internas de *A. tumefaciens* SC5. La fracción neutra obtenida de la incubación de membranas internas de la cepa SC5 con UDP[14 C]Glc

(ver Materiales y Métodos) se sometió a cromatografía líquida de alta de presión. Se utilizó una columna "Carbohydrate Analysis", usando como solvente de corrida Acetonitrilo:agua [65:35] a 1 ml/min. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se determinó la radioactividad. (—) [^{14}C], SC5, (--) [^3H], A723.

El glucano β (1-2) celular acumulado por las cepas A723 y SC5 se extrajo con TCA 1% y se sometió, como se describe en Materiales y Métodos, a cromatografía en columnas de Bio Gel P-4. El glucano β (1-2) producido por la cepa salvaje eluyó con un $K_{AV}=0,20$ (no mostrado) idéntico al compuesto observado en la cepa SC5. Estos resultados indican que el tamaño del glucano producido in vivo por la cepa SC5, es el mismo que el producido por la cepa salvaje.

Hallazgo de proteínas intermediarias de distintos tamaños.

El plásmido pRAR205 contiene un fragmento de DNA de 9 kb clonado en el sitio Bam HI del vector pTJS1140⁽³⁴⁾. La región *chvB* se encuentra en el extremo 3' del fragmento y abarca 5 kb de DNA. Las restantes 4 kb en el extremo 5' no están involucradas en la virulencia. La *pi150* podía haber estado codificada dentro o fuera de la región *chvB*. Por otra parte, si estuviera codificada en dicha región, y fuera un fragmento de la *pi235*, el gen completo debiera extenderse por lo menos 2.2 kb "downstream" el extremo 3' de la región *chvB*. Por esta razón se prepararon membranas internas de cepas de *A. tumefaciens* con inserciones del transposón *Tn3HoHo1* 0,5 kb "upstream" (cepas ME103 y ME32, avirulentas) y 2 kb "downstream" del extremo 3' del locus *chvB* (cepas ME113 y ME101, virulentas) (Fig. 13). Las membranas internas de estas cepas incubadas con UDP[^{14}C]Glc, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig. 16). En las cepas ME103, ME32, ME112 y ME101 no se detectó *pi235* por tinción con Coomassie Blue (Fig. 16 A).

Las membranas internas de la cepa ME103 no presentan radioactividad incorporada a ninguna proteína, lo cual es coherente con su incapacidad para sintetizar glucano β (1-2); en la cepa ME32 la radioactividad estaba asociada a una proteína de 145 kDa (Fig. 16 B carril 3). En el caso de membranas internas de la cepa ME112 se encontró que la radioactividad estaba asociada a proteínas entre 172 y 150 kDa. En la cepa ME101 la radioactividad apareció distribuida en una zona de peso molecular mayor a 235 kDa, y en otras seis proteínas de las cuales la de mayor peso molecular corresponde a 208 kDa. La radioactividad asociada a estas proteínas (cepas ME32, ME112 y ME101) disminuyó luego de un "chase" con UDPGlc no radioactivo, indicando un comportamiento típico de intermediarias.

Estudios sobre la síntesis in vitro del glucano β (1-2) por las cepas ME 103, ME32, ME112 y ME101.

Debido a que las membranas internas de las cepas ME32, ME112 y ME101 poseen proteínas que se comportan como intermediarias y que en la cepa ME103 no se detectan proteínas intermediarias, se estudió si estas membranas internas eran activas en la síntesis de glucano β (1-2).

Las fracciones neutras obtenidas luego de la incubación de membranas internas con UDP[^{14}C]Glc (ver Materiales y Métodos) se sometieron a cromatografía líquida de alta presión. Se utilizó como standard interno [^3H]glucano β (1-2) sintetizado por membranas internas de *A. tumefaciens* A-723. Como se mencionó anteriormente las membranas internas de la cepa ME103 no sintetizan glucano β (1-2). En los otros tres casos se observó síntesis de glucanos cuyos tiempos de retención y abundancia relativa correspondían al producido por A-723 (Fig. 18 A, B, C), indicando que no está afectada la síntesis de glucano β (1-2).

Un párrafo aparte merece el caso de la cepa ME32. Esta cepa es avirulenta, pero poseía una proteína intermediaria activa y sintetiza glucano β (1-2). Se discutirá más adelante este caso particular.

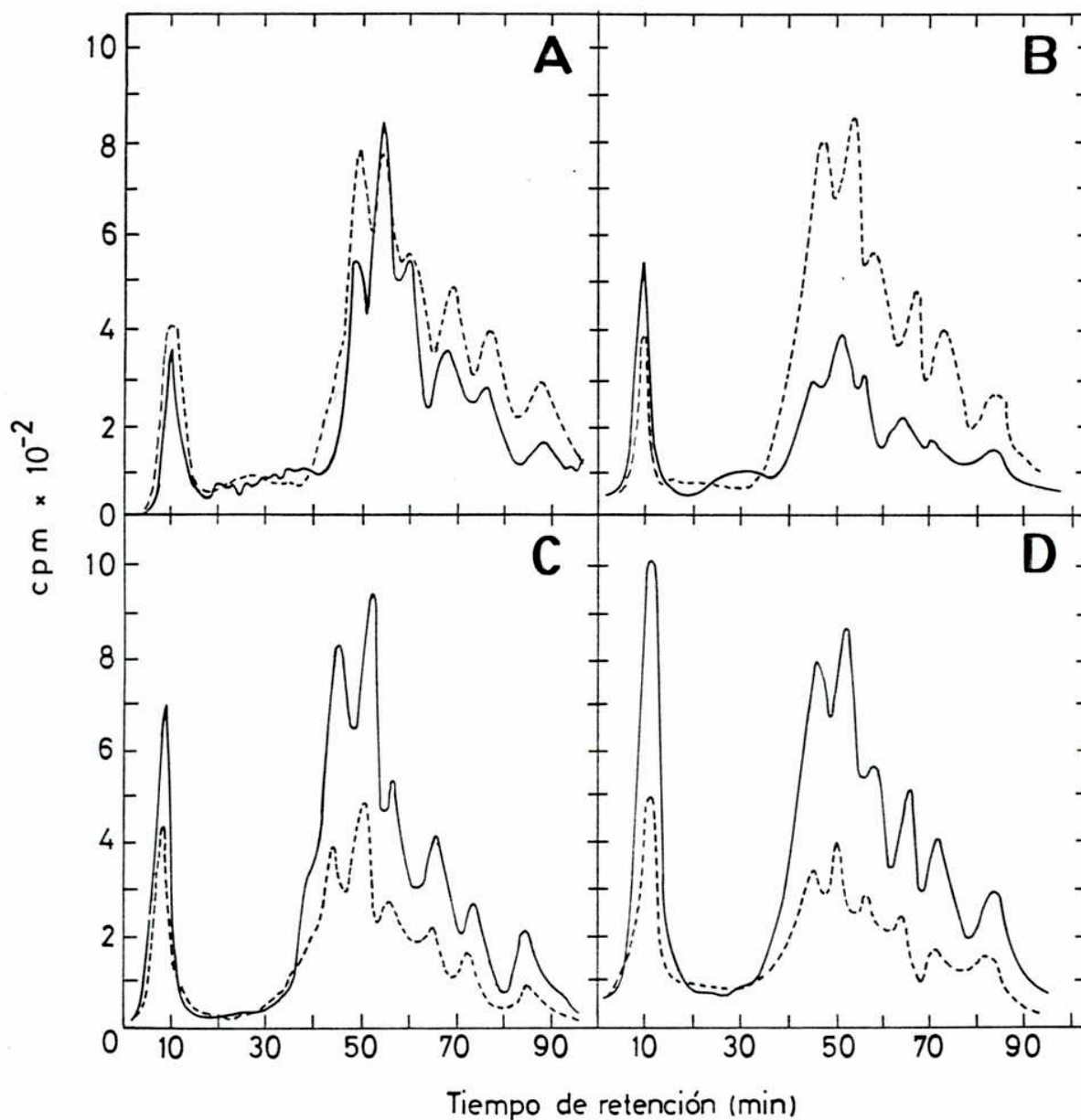


Figura 18) Polisacáridos sintetizados in vitro por membranas internas de *A. tumefaciens* ME32, ME101, ME112, y A723. Se procedió de acuerdo a lo indicado en la Figura 5. La línea punteada corresponde al standard interno de [^3H]glucano β (1-2) sintetizado por la cepa A723. Panel A) ME101,

Panel B) ME32, Panel C) ME112, y panel D) A723 (membranas internas preincubadas con tripsina bajo condición 1).

Presencia del glucano β (1-2) en extractos celulares de las cepas ME32, ME35 y ME101.

Los extractos de TCA 1% provenientes de las cepas ME32, ME35, ME101 y A-723 se cromatografiaron en columnas de Bio Gel P4. El polisacárido de $K_{AV}=0,20$ presente en la cepa salvaje (Tabla IX) que corresponde al glucano β (1-2), se encontró en las tres cepas. La cantidad de polisacárido recuperado en cada una de las cepas se detalla en la Tabla I. La cepa ME35 (cuya proteína intermediaria se estudiará en el próximo apartado) produjo poco más del doble que la cepa salvaje, la cepa ME101 un 50% más y la cepa ME32 aproximadamente la misma cantidad. Estos resultados indican que la acumulación del glucano no está afectada en ninguna de estas cepas que contienen proteínas intermediarias de menor tamaño. Entre ellas se destaca la cepa ME32 que acumula glucano β (1-2) en cantidad semejante a la cepa salvaje, pero es avirulenta.

TABLA IX
GLUCANO β (1-2) RECUPERADO DE DISTINTAS CEPAS

CEPA	K_{AV}^A	CANTIDAD ^B
A348	0,20	1,73
ME32	0,20	1,46
ME35	0,20	4,21
ME101	0,20	2,61

^A Determinado en Bio Gel P-4.

^B mg. de azúcar/mg. de peso húmedo de células.

Mapeo bioquímico del gen de la pi235.

Para determinar el tamaño del fragmento de DNA que codificaba para esta familia de proteínas intermediarias, y verificar si el caso de la cepa ME101 era o no una excepción, se investigaron las proteínas intermediarias producidas por cepas con inserciones del transposón *Tn3HoHo1* a distintas distancias "downstream" del extremo 3' del locus *chvB*. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos luego de haber sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida las membranas internas aisladas de las distintas cepas incubadas con UDP[¹⁴C]Glc. Por tinción con Coomassie Blue sólo en las cepas ME112 y ME111 se observaron proteínas de peso molecular comprendido entre 150 y 235 kDa que no estaban presentes en la cepa salvaje (Fig. 19 A). En la Tabla X se muestran los pesos moleculares de las proteínas intermediarias formadas por las membranas internas de las distintas cepas luego de incubarlas con UDP[¹⁴C]Glc. Estos pesos moleculares fueron calculados a partir de los datos obtenidos de la fluorografía (Fig. 19 B). En la Figura 20 se muestra la correlación lineal existente entre el incremento del peso molecular aparente de las proteínas intermediarias y el incremento de la distancia entre el extremo 3' de la región *chvB* y la inserción del transposón. El desvío respecto de la linealidad observado en la cepa ME111 se atribuyó a una falta de exactitud en la estimación del peso molecular en proteínas mayores que 205 kDa. Se concluyó que la proteína intermediaria en la biosíntesis del glucano β (1-2) estaba codificada en un gen que comenzaba

aproximadamente 4 kb "upstream" el extremo 3' del locus *chvB*, y se extendía hasta un punto ubicado entre 3,1 y 4,4 kb "downstream" dicho extremo (Fig. 21).

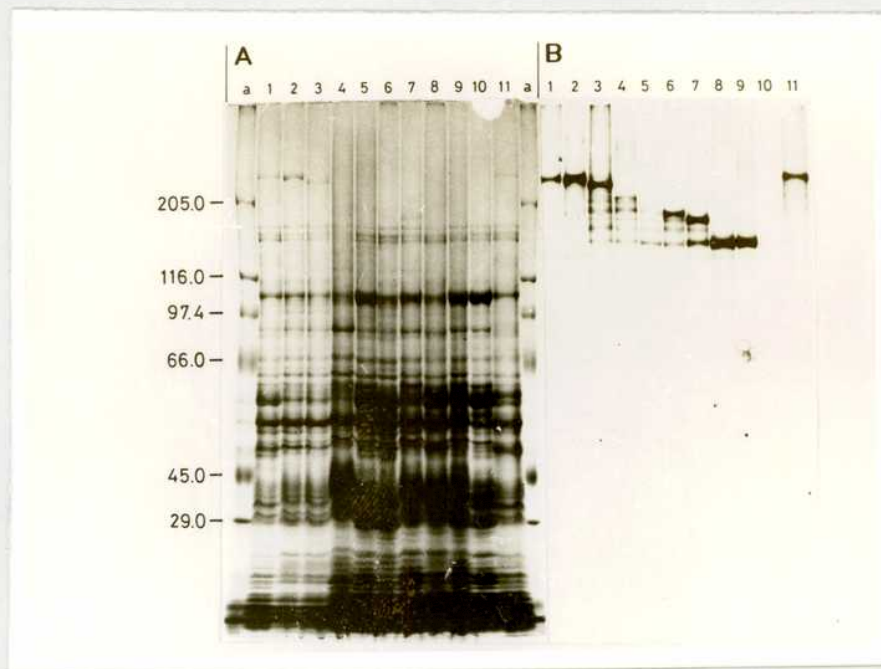


Figura 19) Proteínas intermediarias incompletas presentes en distintas cepas de *A. tumefaciens*. Se incubaron membranas internas de distintas cepas de *A. tumefaciens* en presencia de UDP[¹⁴C]Glc como se detalla en la Fig. 4. La fracción insoluble en TCA 10% se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida. A) tinción de proteínas con Coomassie Blue, B) fluorografía. Carril a) Standards de alto peso molecular, 1 y 11) A723; 2) ME4; 3) ME111; 4) ME35; 5) ME101; 6) ME3; 7) ME112; 8) SC5; 9) ME32; y 10) ME103. Los números sobre la izquierda indican el peso molecular en KDa de los standards.

TABLA X
COMPARACION DEL TAMAÑO DE PROTEINAS INTERMEDIARIAS TRUNCADAS CON EL FRAGMENTO DE DNA CODIFICANTE

1. Cepa	2. Peso Molecular KDa ^a	3. Distancia al extremo 3' (kb) ^b	4. Tamaño estimado del DNA codificante (kb) ^c	5. Origen del gen (kb) ^d (KDa) ^e	6. Diferencia de peso molecular
ME32	145	-0,2	3,8	4,0	-5
SC5	150	0	3,9	3,9	0
ME112	177	0,8	4,6	3,8	27
ME3	188	1,2	4,9	3,7	38
ME101	208*	1,6	5,4	3,8	58
ME35	218	2,1	5,7	3,6	68
ME111	229	3,1	6	2,9	79
ME4235	235	4,4	6,1	1,7	85

^a Tamaño de las proteínas calculado a partir de los valores obtenidos en la Figura 19 B.

^b Distancia entre el extremo 3' de la región *chvB* y el sitio de inserción del transposon Tn3HoHo1 en cada cepa.

^c Se calculó el tamaño del fragmento de DNA que codificaría para la proteína intermediaria considerada (1 aminoácido=3 bases=115 Da).

^d El origen del gen se calculó restando del tamaño del gen el fragmento de DNA codificante (Columna 4-columna 3).

^e Porción de la proteína intermediaria que está codificada downstream de la región *chvB* (columna 2-150 KDa).

* Se consideró la proteína intermediaria de este tamaño, pues la de mayor tamaño es una fusión con β -galactosidasa.

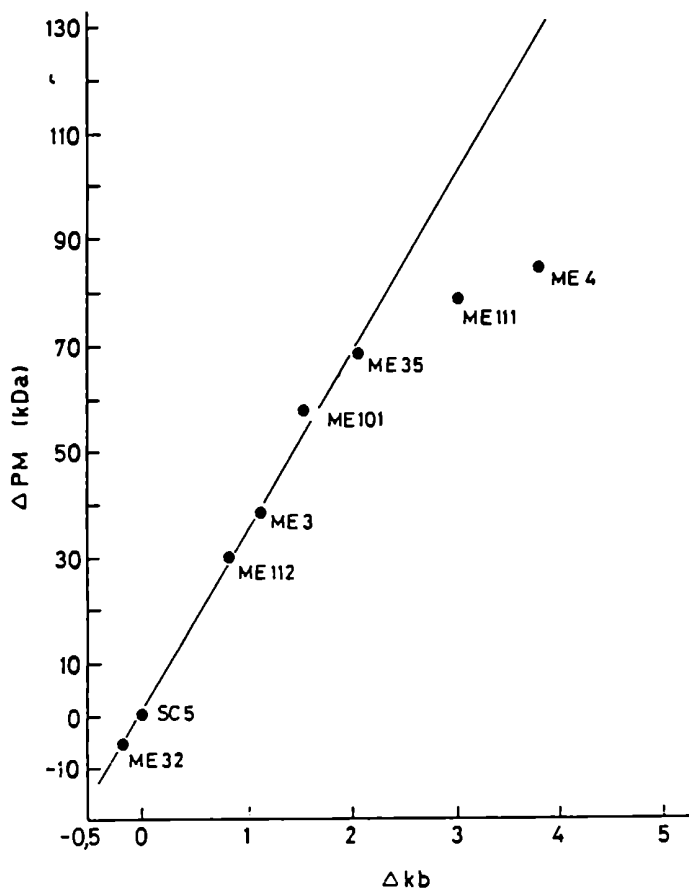


Figura 20) Correlación entre el peso molecular de las proteínas intermediarias y la distancia entre la localización del transposón *Tn3HoHo1* y el extremo 3' del locus *chvB*. Se utilizaron los valores obtenidos en la tabla II (ΔPM columna 6; Δkb columna 3). En la cepa ME101 se consideró el valor de 208 kDa.

Estudio de la región *chvB* en la mutantes ME2, ME116, y ME32.

Los datos obtenidos hasta este momento eran incongruentes con algunos resultados publicados previamente. En primer término, la localización en el locus *chvB* de las inserciones del transposón *Tn3HoHo1* en las cepas virulentas ME2 y ME116 (Fig. 13). Esta localización había sido establecida sobre el plásmido en el cual se produjeron las inserciones del transposón⁽³⁴⁾. Posteriormente este plásmido se introdujo en la cepa salvaje A348, y se realizó la homogenización por intercambio de marcadores (resistencia a antibióticos)⁽¹¹⁷⁾. En este proceso la región mutada contenida en el plásmido se intercambia con la región cromosomal homóloga salvaje. Como resultado final, la región salvaje se pierde, y la región mutada queda incorporada al cromosoma^(34,117). Si en la cepa ME116 la inserción del transposón *Tn3HoHo1* se hubiera producido donde fue originalmente mapeada en el plásmido, el péptido que debiera sintetizarse sería más pequeño que el presente en la cepa ME103 e inactivo en la biosíntesis del glucano. Sin embargo se detecta una p235. Para determinar si el sitio mapeado en el

plásmido correspondía al cromosomal, se extrajo DNA total de la cepa ME116 y también de las cepas ME2, 13, 32, 39, 73, 103, y 64. Salvo para las cepas ME2 y ME116 que poseían la región *chvB* intacta, se confirmó que el mapa informado previamente era correcto.

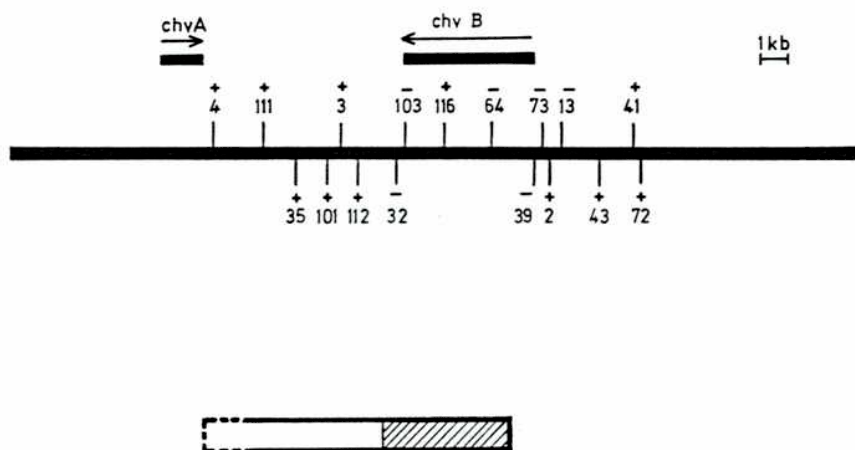


Figura 21) Ubicación del gen estructural de la proteína intermediaria de 235KDa. Con las barras negras se indican los loci *chvA* y *chvB*. Las flechas indican la dirección de transcripción. Las líneas verticales indican los sitios de inserción del transposón *Tn3HoHo1*. Las líneas que están hacia arriba indican aquellas inserciones donde el gen *lacZ* quedó en el sentido de transcripción del locus *chvB*. Los signos (+) y (-) indican fenotipo virulento y avirulento respectivamente. Las líneas hacia abajo indican aquellas inserciones en las que el gen *lacZ* del transposón quedó en sentido contrario al de transcripción del locus. La caja en la zona inferior indica ubicación del gen estructural de la pi235. La zona rayada indica el extremo NH₂ terminal codificado en la región *chvB*.

Por otra parte la cepa ME32 es avirulenta, pero como ya se demostró, la síntesis del glucano β (1-2) no está afectada, lo que constituía una excepción a la correlación observada entre virulencia y síntesis de glucano β (1-2) en las mutantes ChvB. Otra diferencia con las mutantes ChvB es que esta cepa es efectiva en el ensayo de unión a células vegetales. Para determinar si esta cepa era una doble mutante, se introdujo en ella el cósmido pCD523, que contiene las regiones *chvA* y *chvB* completas. La cepa transconjugante seguía siendo avirulenta, indicando que la mutación responsable de su fenotipo no está localizada en el locus *chvB* ni en el *chvA*.

Parte de los experimentos mencionados en este apartado, fueron realizados por el Dr. G. Cangelosi, en el laboratorio del Dr. E. Nester de la Universidad de Washington, Seattle, USA.

Actividad β -galactosidasa unida a membranas internas en la cepa ME101.

Como se describió previamente, el transposón *Tn3HoHo1* puede generar fusiones transcripcionales entre el gen *lacZ* y genes de la célula receptora⁽¹²⁸⁾. Esta propiedad es útil para

determinar el sentido de transcripción de los genes que interrumpe por medición en la célula entera de la actividad β -galactosidasa. En el caso particular de este trabajo de tesis, fue notable encontrar en la cepa ME101 una proteína intermediaria de mayor tamaño que la presente en la cepa salvaje, lo que podría deberse a la formación de una fusión traduccional entre la proteína intermediaria y la β -galactosidasa. Para determinarlo, se midió la actividad de esta enzima en células enteras y membranas internas purificadas. Como se muestra en la Tabla XI, las únicas membranas internas que mostraron actividad de β -galactosidasa son las provenientes de la cepa ME101. La actividad de la enzima en células enteras de las cepas ME 32 y ME3 fue superior que en la cepa salvaje A723, pero en ninguna de ellas se observó actividad unida a membrana, indicando que en ninguna de ellas se habían generado fusiones traduccionales con proteínas de membranas.

TABLA XI
ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA EN CELULAS ENTERAS Y MEMBRANAS INTERNAS

CEPA	ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA ^{A)}	
	Células enteras	Membranas Internas
A723	12,4	<0,1
ME32	23,8	<0,1
ME3	18,7	<0,1
ME101	111,4	61,2

A) Unidades de enzima por mg. de proteína.

Digestión parcial con tripsina de membranas internas de *A. tumefaciens*.

Síntesis de glucano β (1-2)

Tal como se describió existen cepas virulentas de *A. tumefaciens* que producen proteínas intermediarias de menor tamaño que la pi235, indicando que proteínas truncadas son activas en la síntesis del glucano β (1-2). Con el objeto de averiguar si fragmentos de la pi235 generados por proteólisis eran también capaces de actuar como intermediarios en la biosíntesis del glucano β (1-2), se trataron membranas internas de *A. tumefaciens* A-723 con tripsina. Los tratamientos se realizaron de manera tal que la proteólisis no fuera extensiva. La digestión se detuvo con inhibidor de tripsina de soja (SBTI). Las membranas internas tratadas de esta manera se incubaron durante distintos tiempos con UDP[¹⁴C]Glc (condición 1) (ver Materiales y Métodos). Se determinó la radioactividad presente en la fracción neutra y en la fracción insoluble en TCA 10% (Fig. 22). En el control sin tratar la incorporación de radioactividad a la fracción neutra (glucano β (1-2)), fue lineal hasta los 20 min. En las membranas tratadas con tripsina, la incorporación fue lineal hasta los 10 min (Fig. 22 A). La radioactividad en la fracción insoluble en TCA 10% alcanzó un máximo a los 10 min independientemente del tratamiento con tripsina (Fig. 22 B). La fracción neutra obtenida se sometió a cromatografía líquida de alta presión. Los glucanos observados fueron indistinguibles de los glucanos formados por membranas internas no tratadas (Fig. 18 D).

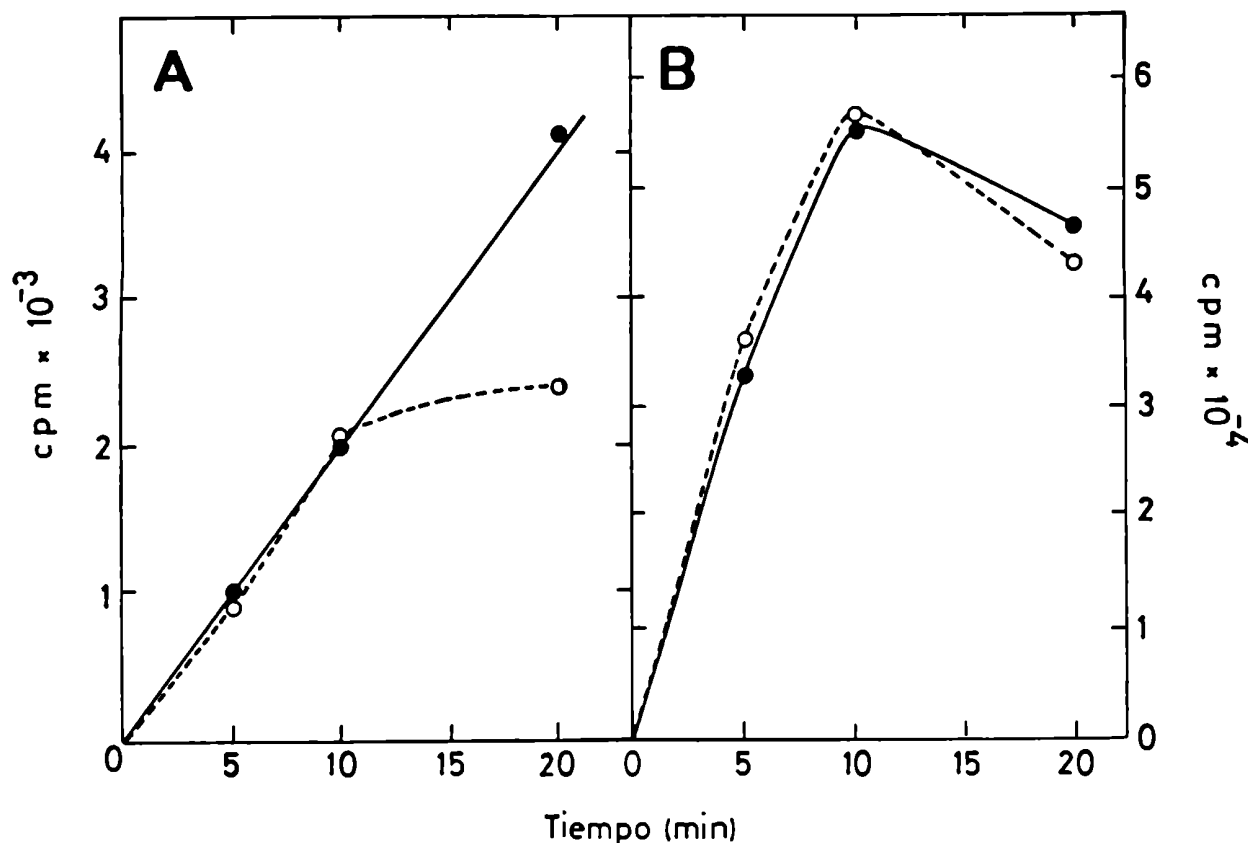


Figura 22) Incorporación de $[^{14}\text{C}]$ glucosa a glucano β (1-2) y proteína intermediaria por membranas internas de A723 preincubadas con tripsina. Membranas internas de A723 se preincubaron con tripsina a 10°C durante 5 min (condición 1). Posteriormente se agregó UDP $[^{14}\text{C}]$ Glc y SBTI y se incubó durante 10 min. A) Incorporación a la fracción neutra. B) Incorporación a la fracción insoluble en TCA 10%. (●) Membranas internas sin preincubar, (○) membranas internas preincubadas con tripsina.

Formación de polipéptidos intermediarios.

La fracción insoluble en TCA 10% proveniente del tratamiento con tripsina en la condición 1 se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida, su fluorografía se muestra en la figura 23. En el carril 1 y 2 se muestra el control en el que el SBTI fue agregado a la mezcla de incubación antes que la tripsina. No se observó inhibición de la incorporación de la radioactividad a la $\text{pI}235$. También se verificó que actuaba como intermediario, debido a que la radioactividad asociada a ella disminuyó luego de la adición de UDPGlc no radioactivo (carril 2).

La digestión con tripsina genera 3 nuevos fragmentos de 220, 180, y 95 kDa (Fig. 23 carril 3 y Fig. 24 carril 2) que incorporaron radioactividad a partir de UDP $[^{14}\text{C}]$ Glc. También se observó una reducción de la radioactividad asociada a la $\text{pI}235$.

La radioactividad unida a los fragmentos fue desplazada por el agregado de UDPGlc no radioactivo (Fig. 23 carril 4) indicando que en esos fragmentos la actividad como intermediario estaba conservada.

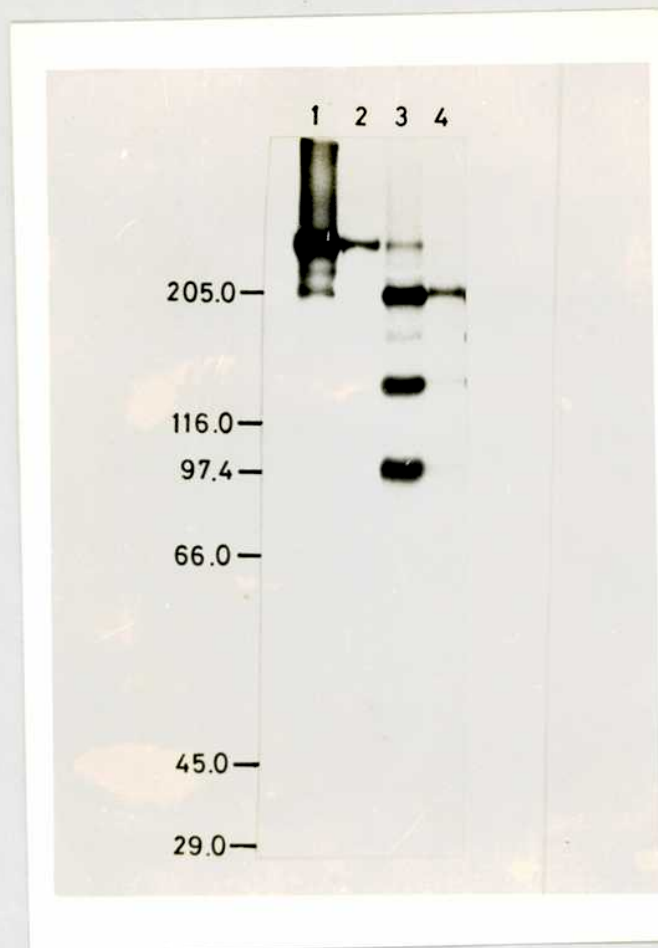


Figura 23) Polipéptidos intermediarios en la biosíntesis del glucano β (1-2). Membranas internas se preincubaron a 10°C con tripsina, al cabo de 5 min se agregó $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ y SBTI (en el control estos se agregaron junto con la tripsina) y se incubaron durante otros 10 min. La fracción insoluble en TCA 10% se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida. La radioactividad se visualizó por fluorografía. Carriles 1 y 2) control; carriles 3 y 4) tratado con tripsina. Los carriles impares corresponden al pulso y los pares al chase. Los números a la izquierda indican el peso molecular en kDa de los standards. El chase se realizó como en la Figura 16

Digestión parcial de la pi235 previa incubación con $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{Glc}$

Cuando la digestión con tripsina se realizó sobre membranas internas incubadas previamente con $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ (Condición 2, Materiales y Métodos), se observó como diferencia más notable respecto a la condición 1, la ausencia del fragmento de 90 kDa, y la aparición de un péptido de peso molecular aparente menor a 20 kDa (Fig. 24 carril 3). Estos resultados indican que el patrón de digestión con tripsina difiere de acuerdo a si la digestión es realizada antes o después de la incubación con UDPGlc .

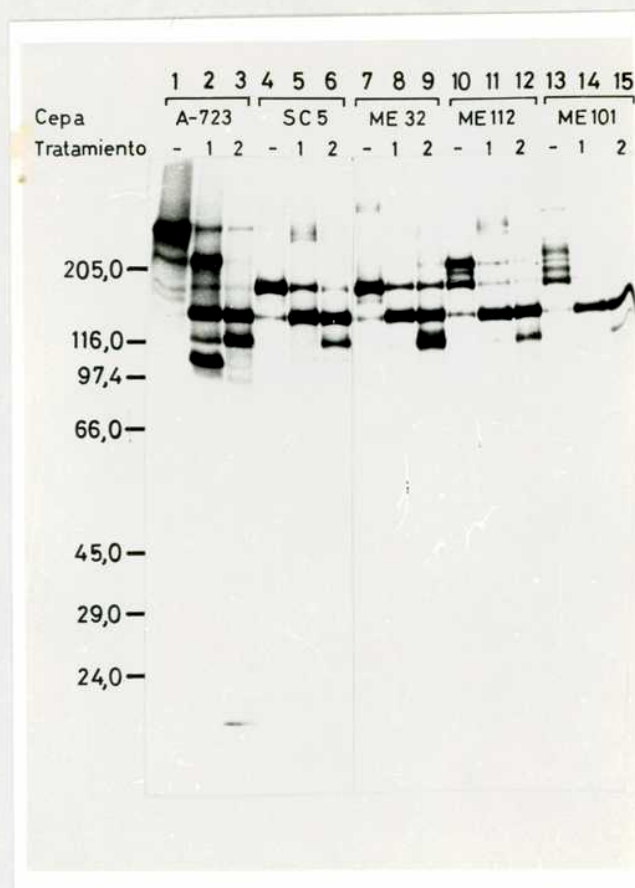


Figura 24) Polipeptidos originados por tratamiento con tripsina de membranas internas de distintas cepas. Las membranas internas de distintas cepas fueron incubadas con UDP[¹⁴C]Glc durante 10 min. Lo indicado como tratamiento corresponde a: (-) control, (1) tratamiento con tripsina en condición 1, (2) tratamiento con tripsina en condición 2. Los números a la izquierda indican el peso molecular en kDa de los standards.

Digestión parcial con tripsina de membranas internas de cepas que producen proteínas intermediarias de menor peso molecular.

Con el objeto de demostrar la relación existente entre la pi235 y las proteínas intermediarias de menor peso molecular aparente observadas en las mutantes estudiadas, se procedió a comparar su mapa tróptico.

Como se muestra en la Fig. 24 todas las mutantes conservan el fragmento de 130 kDa (condición 1), y los de 130 y 110 kDa (condición 2). Están ausentes los de 90 kDa y <20 kDa (cond. 1 y 2 respectivamente). Estos resultados demuestran que existe una región común entre la pi235 y las proteínas intermediarias de todas las mutantes analizadas. Esta región común genera los fragmentos de 130 y 110 kDa que necesariamente están codificados por la región *chvB* (ver mapa de localización de las inserciones analizadas en la Fig. 21).

El fragmento de 90 kDa obtenido en la condición 1 con la cepa salvaje, y ausente en las mutantes, puede deberse a la presencia de un segundo sitio de glicosilación codificado fuera de la región *chvB*. Para verificar esta posibilidad, se sometieron a digestión con tripsina bajo condición 1

membranas internas de las cepas ME35 y ME 111. El fragmento de 90 KDa está ausente en la cepa ME35 (Fig. 25 A), y presente en la cepa ME111 (Fig. 25 B). Esto indica que el segundo sitio de glicosilación estaría codificado entre las inserciones ME35 y ME111 (Fig. 21).

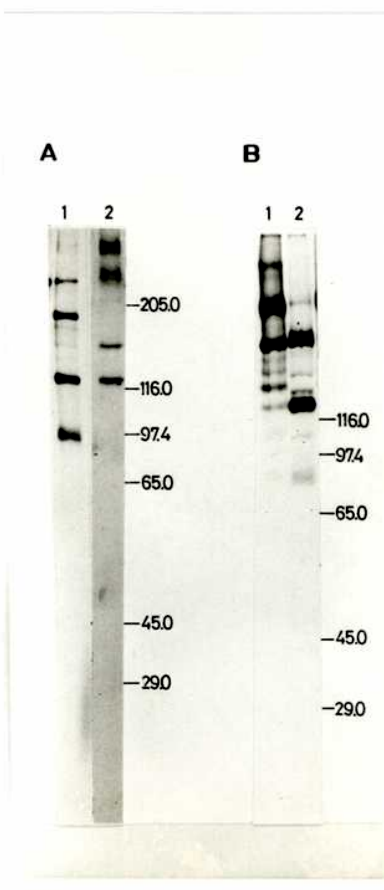


Figura 25) Polipéptidos originados por el tratamiento con tripsina de membranas internas de las cepas ME35 y ME111. Las membranas internas de las cepas ME35 (Panel A carril 2) y ME111 (Panel B carril 2) se trataron con tripsina en condición 1 de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. La fracción insoluble en TCA 10% se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida. La radioactividad se visualizó por fluorografía. El carril 1 corresponde a la cepa salvaje (*A. tumefaciens* A348). Los números a la izquierda indican el peso molecular en KDa de los standards.

DISCUSION

El locus *chvB* codifica funciones involucradas en la unión de *A. tumefaciens* a células vegetales. Las mutantes ChvB son inmóviles e incapaces de unirse y transformar células vegetales. Estas mutantes tampoco producen el glucano β (1-2) cíclico, ya que carecen de la pi235⁽¹⁶¹⁾. Debido a que las mutantes ChvB son pleiotrópicas, la avirulencia puede deberse tanto a la ausencia de glucano β (1-2) como a la de algún otro factor no detectado. En lo que hace a la biosíntesis de este polisacárido, la única proteína identificada es la proteína intermediaria de 235 KDa^(161,162), dado el gran tamaño de esta proteína, no se puede descartar que ella contenga todas las actividades enzimáticas necesarias para la biosíntesis del glucano. La pi235 no se sintetiza en mutantes ChvB.

Por estudios de mutagénesis sitio dirigida se había determinado que el locus *chvB* tenía un tamaño de 5 kb⁽³⁴⁾. Existían dos cepas virulentas (ME2 y ME116) con inserciones de transposón *Tn3HoHo1* dentro de la región *chvB*, que sugerían la existencia de por lo menos 3 genes, ninguno del tamaño suficiente para codificar la pi235. El estudio de la región *chvB* de las cepas ME2 y ME116 indicó que las inserciones están fuera de este locus. Aún así, el tamaño de la región *chvB* es insuficiente para codificar por la pi235, ya que se requiere un fragmento de 6,2 kb.

Una mutante ChvB complementada con un plásmido que posee la región *chvB* produce una proteína intermediaria de 150 kDa. Esta pi150 posee algunos fragmentos trípticos en común con la pi235 indicando que aquella es un fragmento de ésta que aún conserva su actividad biológica. Estos fragmentos trípticos provienen de regiones de la proteína codificados en el locus *chvB*. Estos resultados indican, además, que no es la pi235 lo necesario para virulencia, sino su producto, el glucano β (1-2). Esta observación se confirmó posteriormente cuando se observó que mutantes no infectivos ExoC poseen la pi235 en cantidades aún mayores que la cepa salvaje, pero son incapaces de producir glucano β (1-2) por falta de UDPGlc⁽¹⁴⁵⁾.

Cepas virulentas de *A. tumefaciens* con inserciones del transposón *Tn3HoHo1* a distintas distancias "downstream" del extremo 3' del locus *chvB* producen proteínas intermediarias cuyos tamaños se correlacionan con la distancia entre el sitio de inserción del transposón y el locus *chvB*. Estas proteínas intermediarias también contienen fragmentos trípticos comunes con la pi235 y la pi150. Considerando el tamaño de la proteína intermediaria formada en cada cepa mutante se pudo calcular el tamaño del gen estructural de la pi235.

El gen de la pi235 comienza a 1 kb "downstream" del extremo 5' del locus *chvB*, y finaliza entre 3,1 y 4,4 kb "downstream" el extremo 3' de dicho locus, abarcando como mínimo 7,1 kb. El peso molecular de la proteína derivada de tal fragmento de DNA es de 280 kDa. La diferencia entre este tamaño y el estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida podría deberse a tres razones. La primera es que la asignación del peso molecular aparente se realizó utilizando standards de peso molecular de menor tamaño que la proteína de interés; por lo tanto es factible un error. La segunda razón es que el hecho de que esta proteína está inserta en la membrana permite suponer que tiene muchos dominios hidrofóbicos, por lo tanto uniría más SDS que una proteína citosólica o periférica de membrana, aumentando la movilidad en una electroforesis en geles de poliacrilamida. La tercera razón podría deberse al hecho de que existiría una prepi235 del peso molecular mencionado que sufre un procesamiento proteolítico para insertarse en la membrana interna. Estas hipótesis no son excluyentes, y se debe seguir estudiando para llegar a una conclusión cierta.

La avirulencia de la cepa ME32 no podía ser explicada, ya que posee una inserción del transposón *Tn3HoHo1* en el extremo 3' del locus *chvB*, pero produce una proteína intermediaria de

tamaño muy parecido a la cepa SC5, y no tiene afectada su capacidad de sintetizar glucano β (1-2). Se demostró que en realidad es una doble mutante, ya que la avirulencia no se complementa con un cósmido que lleva las regiones *chvA* y *chvB* completas.

En la cepa ME101 se encuentra una proteína intermediaria de peso molecular mayor a 235 kDa, lo que constituye una sorpresa. En realidad esta proteína resulta de la fusión de la β -galactosidasa con una proteína intermediaria de aproximadamente 208 kDa. La prueba de ello es que, a pesar de que β -galactosidasa es una enzima citosólica, en esta cepa se la encuentra unida a membranas internas.

El tratamiento con tripsina de las membranas internas de la cepa salvaje dio lugar a polipéptidos capaces de actuar como intermediarios en la síntesis del glucano β (1-2). El hecho de haber obtenido fragmentos discretos no se debe a que en la pi235 existan pocos sitios de corte para la tripsina, sino probablemente a que están ubicados en el interior de una vesícula inaccesible para la tripsina, ya que si se rompen las vesículas con SDS 1%, la pi235 se degrada exhaustivamente⁽⁶⁸⁾. El hecho de que no se altere la actividad enzimática de la pi235 indica que los sitios activos están intactos. Es posible que se conserve la estructura terciaria responsable de la síntesis del glucano β (1-2). En el mantenimiento de esa estructura pueden estar involucrados también fragmentos que no hayan incorporado glucosa radioactiva.

En la cepa salvaje se observaron distintos patrones de digestión por tripsina entre la condición 1 y 2. Ya que en la condición 1 la digestión con tripsina se realiza antes de la reacción de síntesis del glucano β (1-2), y en la condición 2 ambas reacciones ocurren simultáneamente. La diferencia observada podría deberse a que durante el curso de la reacción la pi235 sufre cambios estructurales, que exponen nuevos sitios de clivaje a la proteasa. Esto es particularmente visible para el fragmento de 90 kDa, que no se observa en la condición 2.

La ausencia de los fragmentos trípticos de menor peso molecular en las mutantes analizadas podría deberse a dos razones: a) una estructura terciaria distinta y, b) la presencia de dos sitios de glicosilación. En la región *chvB* estaría codificado un sitio de glicosilación, probablemente en las 500 pares de bases situadas entre las inserciones ME103 y ME32 (Fig. 13). El fragmento de 90 kDa obtenido por tratamiento en la condición 1 poseería el segundo sitio de glicosilación que estaría situado "downstream" del locus *chvB* en una ubicación que sería simétrica con la del primer sitio, entre las inserciones ME35 y ME111 (Figs. 21 y 25). El gran tamaño de la proteína intermediaria, el hecho de que sólo una porción de ella es suficiente para la biosíntesis del glucano β (1-2), y la posible existencia de dos sitios de glicosilación simétricos sugieren que el gen de la pi235 podría derivar de la duplicación de un gen ancestral que codificaba para una proteína intermediaria más pequeña. En tal sentido resulta interesante buscar en otras especies alguna proteína que esté involucrada en la biosíntesis de polisacáridos que puedan estar relacionados con el posible gen ancestral. Esta búsqueda también podría llevarse a cabo mediante hibridizaciones, utilizando como sonda DNA del locus *chvB*.

En el mapeo del gen de la pi235, quedó un fragmento de DNA de 1 kb al que no se le ha podido asignar función. Dicho fragmento puede codificar para alguna proteína aún no identificada involucrada en la síntesis del glucano β (1-2) y en la virulencia. También podría codificar para la porción proteica de una posible prepi235 que se escinde por proteólisis, o bien regular la expresión del gen de la pi235. En este aspecto resulta notorio el hallazgo de una proteína, que adicionada junto con una mutante ChvB a una herida, da lugar a la formación de tumor. Esta proteína también restituye la capacidad de estas mutantes de adherirse a células vegetales en suspensión. Esta proteína es de 14 kDa y se la llamó "ricadhesina"⁽¹²⁴⁾. Podría suceder que la ausencia del glucano β (1-2) produzca

alteraciones en la membrana interna de la bacteria como resultado de las cuales se inhiba la secreción de determinadas proteínas, entre las que podría estar la ricadhesina.

CAPITULO 2
CARACTERIZACION DE UNA MUTANTE DE *RHIZOBIUM MELILOTI* QUE PRODUCE
PSEUDONODULOS EN ALFALFA.

RESUMEN

Rhizobium meliloti GRT21s es una cepa mutante que produce pseudonódulos en alfalfa y es inmóvil. Se determinó que es incapaz de formar "báculo de pastor", mancha hialina, e hilo de infección en pelos radiculares de alfalfa. Esta mutante produjo el doble de exopolisacárido que la cepa parental (GR4); pero no se encontró glucano β (1-2) ni en el sobrenadante de medio de cultivo, ni en un extracto celular. La mutante es incapaz de sintetizar in vitro glucano β (1-2) debido a que carece de la proteína de 235 kDa. Las características fenotípicas mencionadas son idénticas a las encontradas en cepas mutantes ChvB de *A. tumefaciens*.

INTRODUCCION

Los resultados expuestos anteriormente indican que la región *chvB* está involucrada directamente en la biosíntesis del glucano β (1-2), por lo que se atribuye al mismo importancia en la virulencia de *A. tumefaciens*. El glucano β (1-2) también está presente en otros miembros de la familia *Rhizobiaceae*, lo que hace suponer que debe existir algún locus homólogo al *chvB* en esas especies. De hecho se buscaron zonas homólogas al *chvB* en otras especies que sintetizan glucano β (1-2). En el caso de *R. meliloti*, se encontró homología con los loci *chvB* y *chvA*⁽³⁹⁾. Esta homología se extiende a *R. phaseoli*, *R. Trifoli* y *R. leguminosarum*, pero no a *B. japonicum*. Recientemente se describió que mutantes sitio dirigidas de *R. meliloti* afectadas en los loci homólogos a *chvA* y *chvB* producían pseudonódulos en alfalfa. Estos loci se denominaron *ndvA* y *ndvB* respectivamente (Fig. 26). Paralelamente en el grupo del Dr. Olivares con el objeto de obtener cepas de *R. meliloti* curadas de los megaplásmidos, se cultivó una cepa salvaje (GR4) a altas temperaturas (entre 37 y 38,5°C). Entre las cepas aisladas se obtuvo una mutante que inducía pseudonódulos en alfalfa. A esta mutante se la llamó GRT21s⁽¹⁴¹⁾, y poseía los tres megaplásmidos característicos de la cepa salvaje.

R. meliloti GRT21s fue estudiada en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos son el objeto de este capítulo.

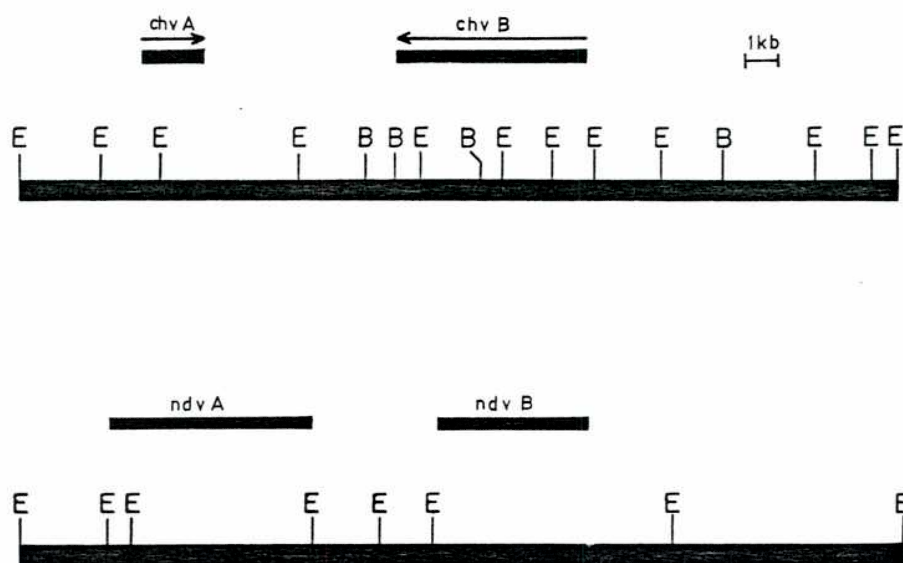


Figura 26) Organización de las regiones *cnv* de *A. tumefaciens* y *ndv* de *R. meliloti*^(34,39). Las barras negras indican la zona que abarca cada locus. La flechas indican el sentido de transcripción de los locus *chvA* y *chvB*. El fragmento Eco RI clonado en el plásmido pTY12 es el que contiene el locus *ndvB*. E. Eco RI, B: Bam HI.

RESULTADOS

Estudio del proceso infectivo en *Rhizobium meliloti* GRT21s.

Debido a que esta mutante es capaz de inducir la formación de pseudonódulos en alfalfa, fue de interés determinar el grado de interacción de la bacteria con la planta. Para ello se estudió el proceso infectivo por microscopía óptica. Las raíces provenientes de plantas inoculadas con la cepa parental (*Rhizobium meliloti* GR4), o con la cepa mutante (*Rhizobium meliloti* GRT21s), se tiñeron con azul de metileno, y se observaron en un microscopio de campo claro.

Las deformaciones de los pelos radiculares y el desarrollo posterior del proceso infectivo inducido por *R. meliloti* GR4 no difirió del descrito para otras cepas salvajes de *R. meliloti*. El primer evento observado fue el giro de 180° en la dirección de crecimiento del pelo radicular, con la formación de un rulo ("curling" o enrulamiento) (Fig. 27 A). Una vez formada esta estructura se produce otro giro de 180° en el mismo sentido que el giro inicial, produciendo la estructura conocida como "báculo de pastor" ("shepherd's crook") (Fig. 27 B). En el punto central de este giro queda atrapada la bacteria. Este constituye el punto de entrada del microorganismo al pelo radicular. Cuando se produce la invasión del pelo por parte de *Rhizobium meliloti*, se forma la denominada mancha hialina, que con el colorante utilizado se tiñe de azul intenso. Desde el punto donde se observa la mancha hialina se comienza a formar el hilo de infección (Fig. 27 C).

En estudios previos se había determinado que *Rhizobium meliloti* GRT21s producía enrulamiento, pero no hilo de infección. Un estudio más detallado confirmó la presencia de rulos (Fig. 28 A). A diferencia de la cepa salvaje, el segundo giro se produjo en ángulos y direcciones distintas a las del giro inicial, dando lugar a estructuras erráticas (Fig. 28 B). En estas deformaciones no se observó mancha hialina ni inicio de hilo de infección.

Producción de exopolisacárido.

Trabajos previos⁽⁸²⁾ habían demostrado que mutantes de *R. meliloti* que no formaban un exopolisacárido detectado por la fluorescencia del Calcofluor^R, inducían la formación de pseudonódulos en raíces de alfalfa.

Las colonias que formaba *R. meliloti* GRT21s, eran mucho más mucosas que las formadas por *R. meliloti* GR4. Además, presentaban mayor fluorescencia en placas de Calcofluor (Fig 29). Debido a que la mucosidad de las colonias y la fluorescencia al Calcofluor correlacionan con la cantidad de exopolisacárido, se procedió a cuantificarlo, determinar su distribución de peso molecular, su composición semicuantitativa y la presencia de sustituyentes no glicosídicos (restos acetilos y piruvilos). Los datos obtenidos se resumen en la Tabla XII. Se observa que la cepa mutante produce el doble de exopolisacárido que la cepa parental. Esta diferencia es la responsable de la mayor mucosidad y fluorescencia en presencia de Calcofluor. No existió ninguna otra diferencia en las características estudiadas.

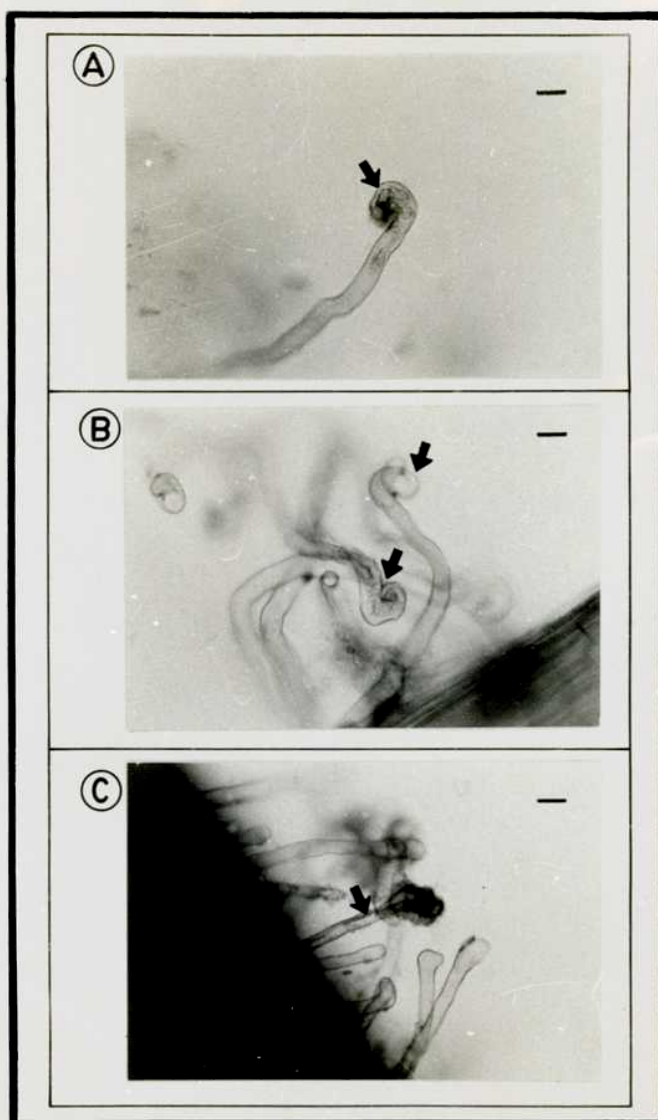


Figura 27) Deformación e infección de la raíz de alfalfa inducida por *R. meliloti* GR4. Las raíces se inocularon y tñieron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.
A) Rulo (flecha), B) Báculo de pastor (flecha), y C) Báculo de pastor, mancha hialina, e hilo de infección (flecha). Barra 20 μm .

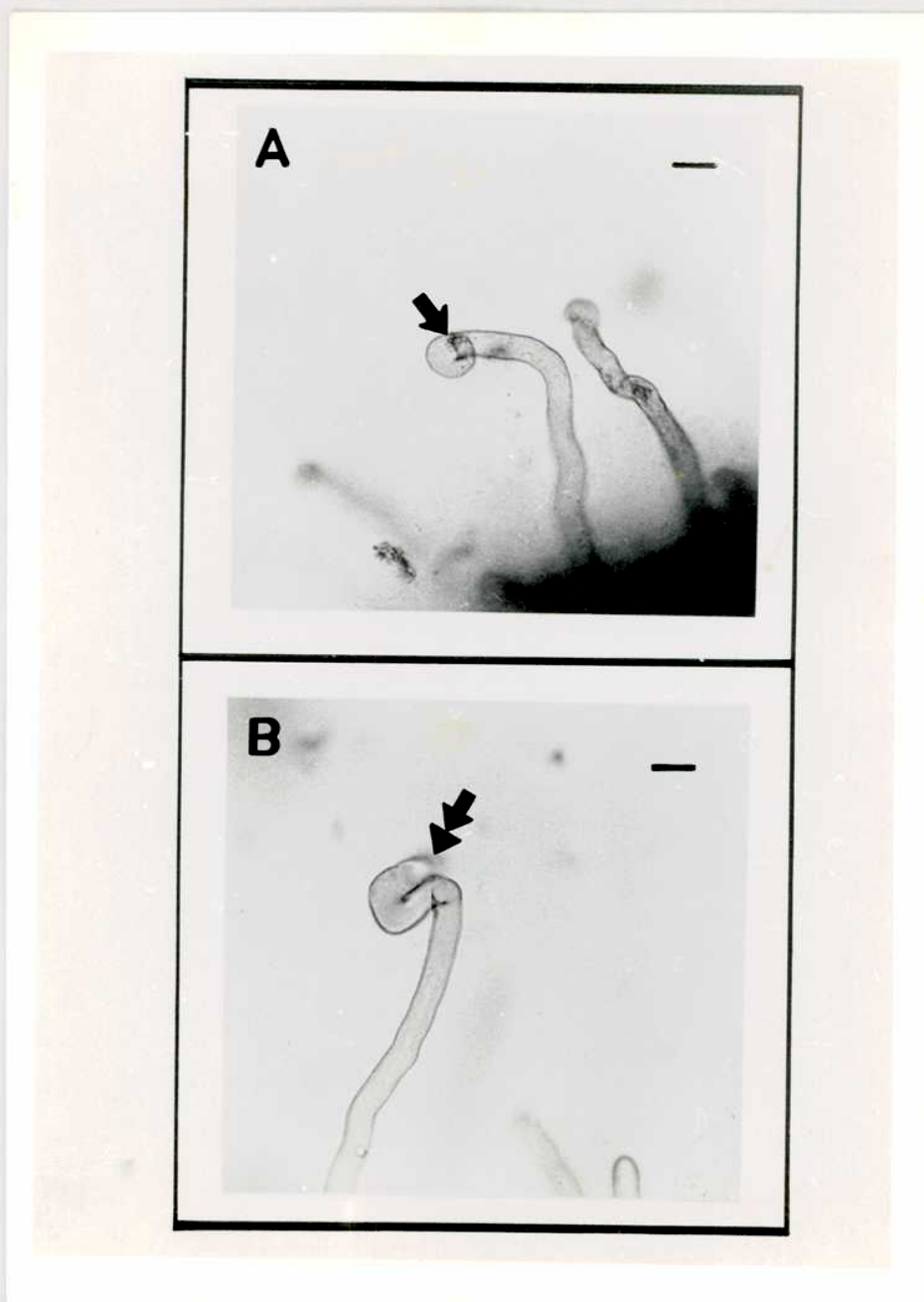


Figura 28) Deformación de la raíz de alfalfa inducida por *R. meliloti* GRT21s. Las raíces se inocularon y tñieron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

A) Rulo (cabeza de flecha), B) Deformación (Flecha y cabeza de flecha). Barra 20 μm .

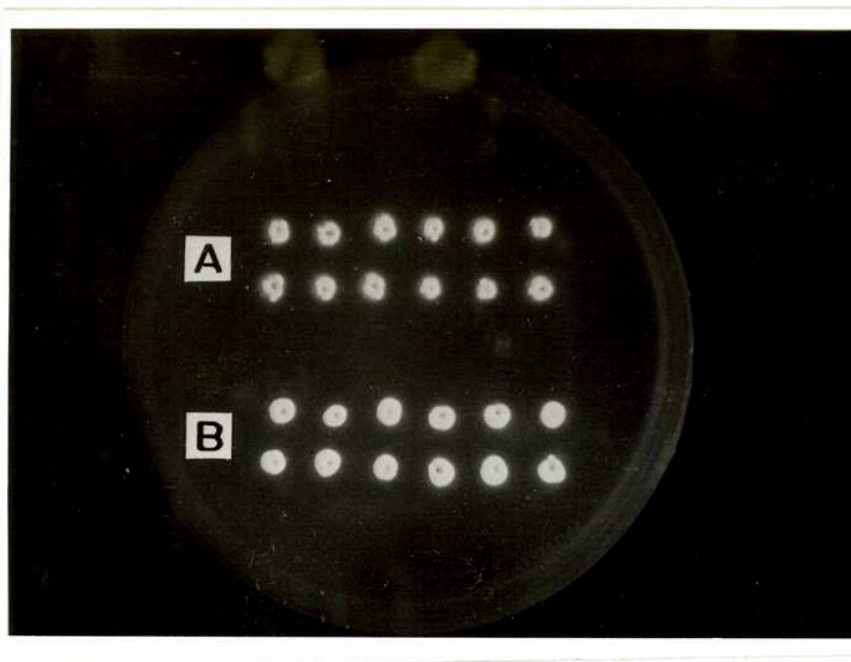


Figura 29) Fluorescencia en placas de Calcofluor de *R. meliloti* GR4 y GRT21s. Se observó la fluorescencia a la luz ultravioleta de distintos clones de las cepas GR4 (A) y GRT21s (B) en placas conteniendo medio LB sólido suplementado con Cellufluor (0,02%)

TABLA XII
CARACTERIZACION DE EXOPOLISACARIDO PRODUCIDO POR *R. meliloti* GR4 Y GRT21s

CEPA	Exopolisacárido ^A	Glucosa ^B	CANTIDAD DE SUSTITUYENTE ^D			
			Galactosa ^B	K_{AV} ^C	O-Acetilo	Ac. pirúvico
GR4	0,78	++++	+	0,16	0,8	1,37
GRT21s	1,53	++++	+	0,16	0,9	1,48

^A mg. de peso seco mg. de proteína celular.

^B Determinado por cromatografía en papel (solvente B). La cantidad de cruces indica intensidad relativa.

^C Determinado por cromatografía en Bio Gel A5m.

^D Moles de sustituyentes /8 moles de azúcar.

Ausencia de glucano β (1-2) en sobrenadantes de cultivo de *R. meliloti* GRT21s.

La sobreproducción de exopolisacárido por parte de *R. meliloti* GRT21s es una característica notable de esta mutante, pero no puede atribuirse a ella la formación de pseudonódulos en raíces de alfalfa, debido a que mutantes de *R. meliloti* con este fenotipo inducen nódulos efectivos. En nuestro laboratorio se observó también sobreproducción de exopolisacárido por parte de *A. tumefaciens* cultivadas en medio de alta osmolaridad, y en mutantes ChvB. Estos antecedentes condujeron a estudiar con mayor detalle otros polisacáridos secretados, en particular el glucano β (1-2). Para ello los sobrenadantes de cultivo de *R. meliloti* GR4 y GRT21s, obtenidos como se detalla en Materiales y Métodos, fueron analizados por cromatografía en columnas de Bio Gel P-4 para determinar la presencia de polisacáridos (Fig 30). En la cepa salvaje se obtuvieron polisacáridos que eluyen con K_{AV} =0,18 y 0,38 respectivamente (Fig. 30 A). En la cepa mutante se encontraron ambos compuestos (Fig.30 B), pero el correspondiente a K_{AV} =0,18 era menor, y su distribución irregular. A fin de proceder a la caracterización de ambos compuestos se juntaron las fracciones correspondientes y se sometieron a hidrólisis total o parcial y cromatografía de los productos, de acuerdo a lo descrito en

Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla XIII. El hallazgo de manosa probablemente se deba a mananos provenientes del extracto de levadura presente en el medio de cultivo. La glucosa y galactosa se atribuyeron a la presencia de unidad repetitiva del exopolisacárido. La hidrólisis parcial del material de $K_{AV}=0,18$ correspondiente a la mutante no generó ni soforosa ni una serie de oligosacáridos homólogos y de grado de polimerización creciente. Estos oligosacáridos se originan por la hidrólisis parcial del glucano β (1-2), y se encontraron cuando se sometió a ese tratamiento el compuesto de $K_{AV}=0,18$ obtenido de la cepa salvaje. Estos resultados indican que el glucano β (1-2) está ausente en el medio de cultivo de la cepa mutante.

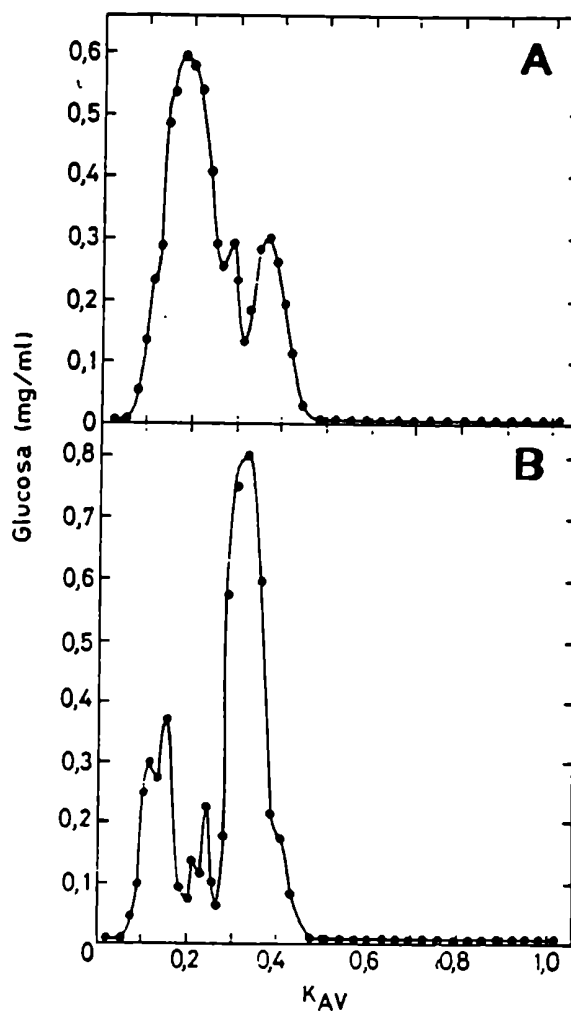


Figura 30) Polisacáridos presentes en el sobrenadante de medio de cultivo de *R. meliloti* GR4 y GRT21s. Los sobrenadantes de medio de cultivo provenientes de *R. meliloti* GR4 (A) o GRT21s (B) se fraccionaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. El concentrado obtenido se cromatografió a través de una columna de Bio Gel P-4. Los azúcares presentes en cada fracción se dosaron por el método del fenol/Sulfúrico.

TABLA XIII
COMPOSICION SEMICUANTITATIVA DE LOS PICOS DE $K_{AV}=0,18$ Y $0,38$

CEPA	K_{AV}	HIDROLISIS TOTAL			HIDROLISIS PARCIAL		
		Glucosa	galactosa	manosa	glucosa	soforosa	manosa
GR4	0,18	++++	+	+	++	+	+
	0,38	++++	+	++	+		+
GRT21s	0,18	++++	+	++	+		+
	0,38	++++	+		+		+

Los azúcares se revelaron con el método de la plata alcalina. Las cruces indican la intensidad de la mancha

Ausencia del glucano β (1-2) en extractos celulares provenientes de *R. meliloti* GRT21s.

La ausencia de glucano β (1-2) en el medio de cultivo *R. meliloti* GRT21s implicaba que esta cepa o no lo sintetizaba, o era incapaz de secretarlo. Para verificarlo, se prepararon extractos celulares con TCA 1% de las cepas salvaje y mutante, y los mismos se cromatografiaron en columnas de Bio Gel P-4 (Fig. 31) en las mismas condiciones descritas en el punto anterior. En el extracto correspondiente a *R. meliloti* GR4 (Fig. 31 A) se separaron tres compuestos de $K_{AV}=0$; 0,18 y 0,83; mientras que en el mismo extracto de *R. meliloti* GRT21s (Fig. 31 B) estaba ausente el compuesto de $K_{AV}=0,18$. Con el fin de caracterizar este polisacárido ausente en la cepa mutant, se juntaron las fracciones comprendidas entre $K_{AV}=0,12$ y 0,27 correspondientes a la cepa salvaje. El concentrado se cromatografió en columnas de Dowex AG2x10 con el objeto de eliminar compuestos aniónicos (unidad repetitiva del exopolisacárido). Bajo estas condiciones el 90% del polisacárido se recuperó en la fracción neutra. Esta fracción de sometió a hidrólisis total o parcial y posterior cromatografía descendente de sus productos. En el hidrolizado total sólo se detectó glucosa. En el hidrolizado parcial se observó la presencia de glucosa, soforosa y de una serie de oligosacáridos homólogos de grado de polimerización creciente que se correspondían con los de un hidrolizado parcial de [14 C]glucano β (1-2) bien caracterizado. De esta manera se verificó que el compuesto de $K_{AV}=0,18$, que no se acumula en *R. meliloti* GRT21s, es glucano β (1-2).

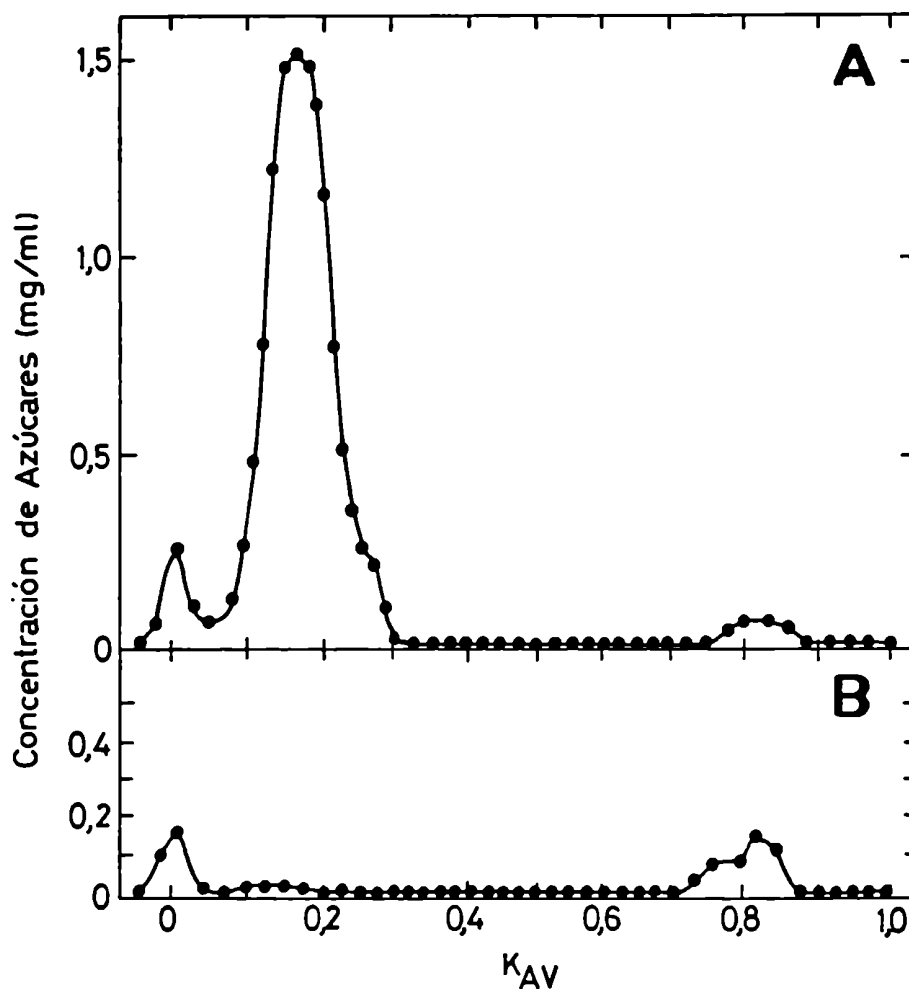


Figura 31) Polisacáridos presentes en extractos celulares de *R. meliloti* GR4 y GRT21s. Los extractos de TCA 1% provenientes de células de *R. meliloti* GR4 (A) o GRT21s (B) y la cromatografía en Bio Gel P-4 se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. El dosaje de azúcares se realizaron de la misma manera que en la figura 30.

Síntesis "in vitro" del glucano β (1-2).

Con el fin de determinar si fracciones subcelulares de *R. meliloti* GRT21s eran capaces de sintetizar "in vitro" glucano β (1-2), se prepararon membranas internas de *R. meliloti* GR4 o GRT21s que se incubaron con UDP[^{14}C]Glc, como se describió en Materiales y Métodos. La cepa salvaje incorporó a una fracción neutra 4,12 pmoles/min.mg proteína de glucosa. La cepa mutante incorporó 30 veces menos glucosa a esta fracción. Ambas fracciones neutras se sometieron a cromatografía líquida de alta presión (Fig. 32), juntamente con [^3H]glucano β (1-2) producido por membranas internas de una cepa salvaje de *A. tumefaciens* (A723). Los compuestos formados por la cepa salvaje eluyeron con distintos tiempos de retención (Tr) (Fig. 32 A). El primer compuesto eluyó con Tr= 5 min y correspondía a un compuesto de bajo peso molecular no caracterizado. Los restantes compuestos eluyeron con Tr mayores a 20 min, y correspondían a glucano β (1-2), cuyo Tr aumenta con el grado de

polimerización. La cepa mutante sólo produjo el compuesto con $Tr = 5$ min (Fig. 32 B), indicando que es defectiva en la biosíntesis del glucano β (1-2). En *R. meliloti* la producción de glucano β (1-2) con grados de polimerización mayores está favorecida en comparación con *A. tumefaciens* (Fig. 32 A)^(61,76).

La fracción neutra de la cepa salvaje fue sometida a hidrólisis ácida parcial en presencia de un standard interno de glucano β (1-2) de *A. tumefaciens*. La cromatografía en papel confirmó su identificación como glucano β (1-2).

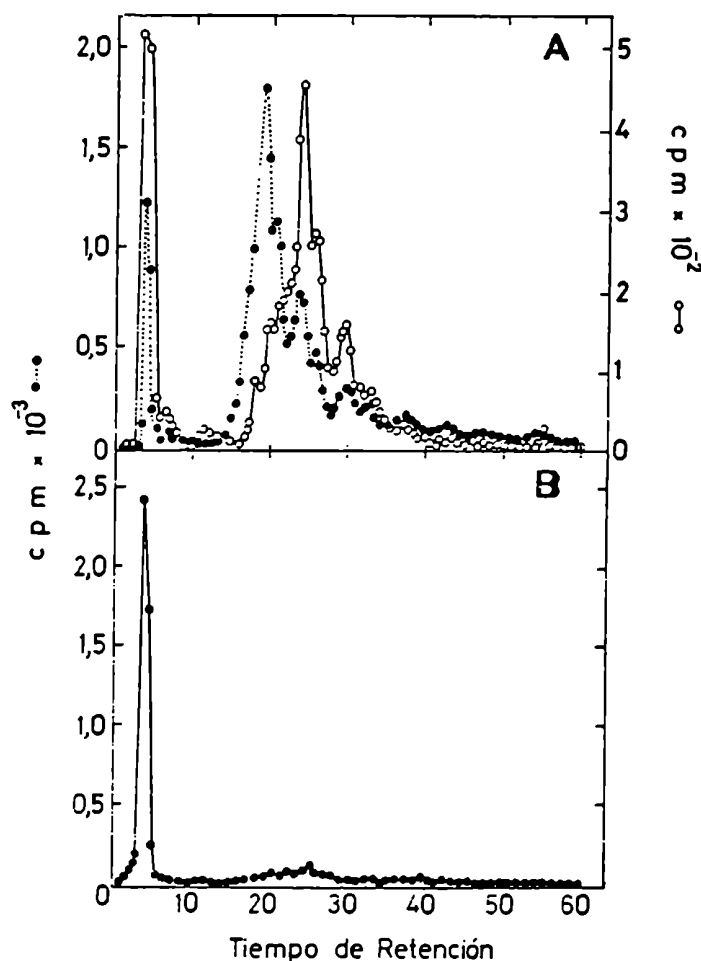


Figura 32) Polisacáridos sintetizados in vitro por membranas internas de *R. meliloti* GR4 y GRT21s. Las fracciones neutras obtenidas por incubación de membranas internas de *R. meliloti* GR4 y GRT21s con $UDP[^{14}C]Glc$, se sometieron a cromatografía líquida de alta presión. A) GR4, línea llena, 10.000 cpm. Con línea punteada se muestra el perfil de la fracción neutra obtenida de la incubación de membranas internas de *A. tumefaciens* con $UDP[^3H]Glc$. B), GRT21s, línea llena, 5.000 cpm. La columna (Lichrosorb-NH₂), se eluyó a 1 ml/min con acetonitrilo H₂O [70:30]. La radioactividad se midió en fracciones de 0,5 ml.

Ausencia de la pi235.

La síntesis del glucano β (1-2) se lleva a cabo utilizando una proteína intermediaria de 235 kDa (pi235) unida a membranas internas. Debido a que la mutante estudiada no produjo glucano β (1-

2) "in vivo" o "in vitro", se estudió la presencia de esta proteína intermediaria. Para ello se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida de membranas internas purificadas provenientes de ambas cepas incubadas con UDP[¹⁴C]Glc (Fig. 33). Luego de la tinción con Coomassie Blue se encontró en la cepa salvaje una proteína con un peso molecular aparente igual a la pi235 de *A. tumefaciens* (Fig. 33 A carriles 1 y 2). Esta proteína estaba ausente en la cepa mutante (Fig. 19 A carriles 3 y 4). La fluorografía (Fig. 33 B) reveló que en la cepa mutante no se incorporó radioactividad a ninguna proteína. En la cepa salvaje la radioactividad se acumuló en una proteína del mismo tamaño que la pi235 de *A. tumefaciens* (carril 1). Esta radioactividad se redujo considerablemente luego de agregar al medio de incubación UDPGlc no radioactiva (carril 4), tal como había sido observado en *A. tumefaciens*.

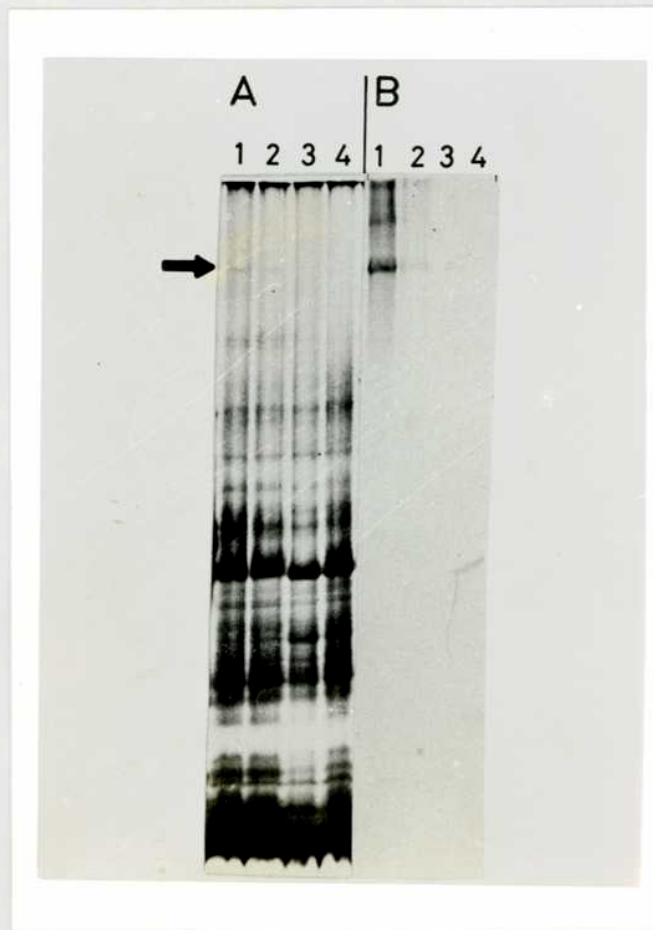


Figura 33) Proteínas presentes en membranas internas de *R. meliloti* GR4 y GRT21s. La fracción insoluble en TCA 10% provenientes de la incubación de las membranas internas de *R. meliloti* GR4 (carriles 1 y 2) y GRT21s (carriles 3 y 4) con UDP[¹⁴C]Glc se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida. A) Tinción con Coomassie Blue, B) Fluorografía. Los carriles impares corresponden al pulso, los pares al chase.

Estudios de movilidad

Se estudió en medios semisólidos la movilidad de las cepas salvaje y mutante. En contraste con lo observado para *R. meliloti* GR4 (Fig. 34 A), *R. meliloti* GRT21s no forma halo de crecimiento alrededor del punto de siembra (Fig. 34 B), indicando que es inmóvil. La cepa mutante también resultó ser inmóvil cuando se lo observó por microscopía de contraste de fase. Por microscopía electrónica de transmisión no se detectaron flagelos en la cepa mutante (Fig. 35).

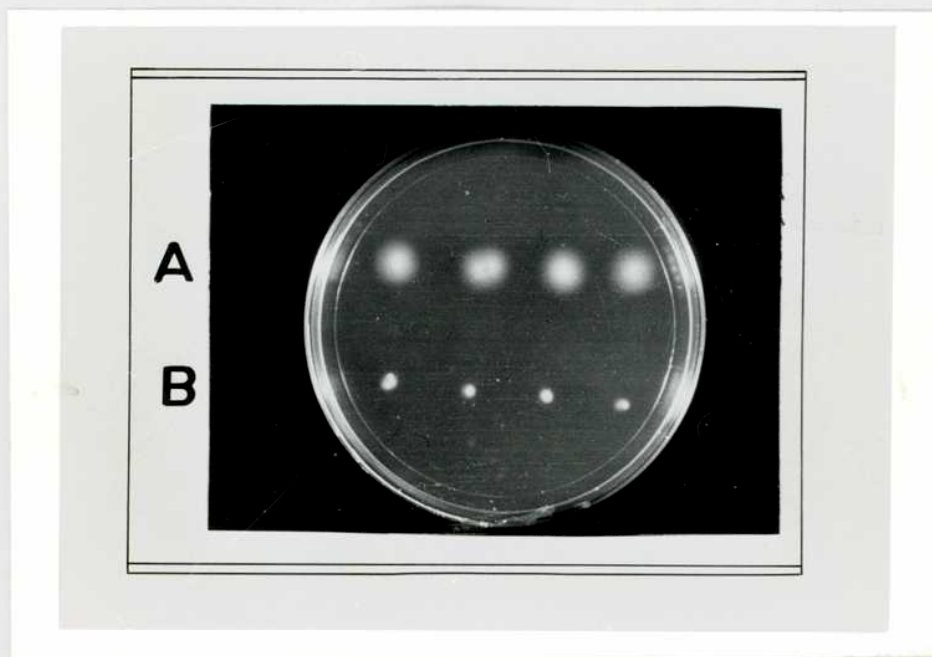


Figura 34) Movilidad de *R. meliloti* GR4 y GRT21s. La movilidad de distintos clones de *R. meliloti* GR4 (A) y GRT21s (B) se determinó por cultivo en medio AMA suplementado con agar 0,35%, durante 48 hs a 28°C.

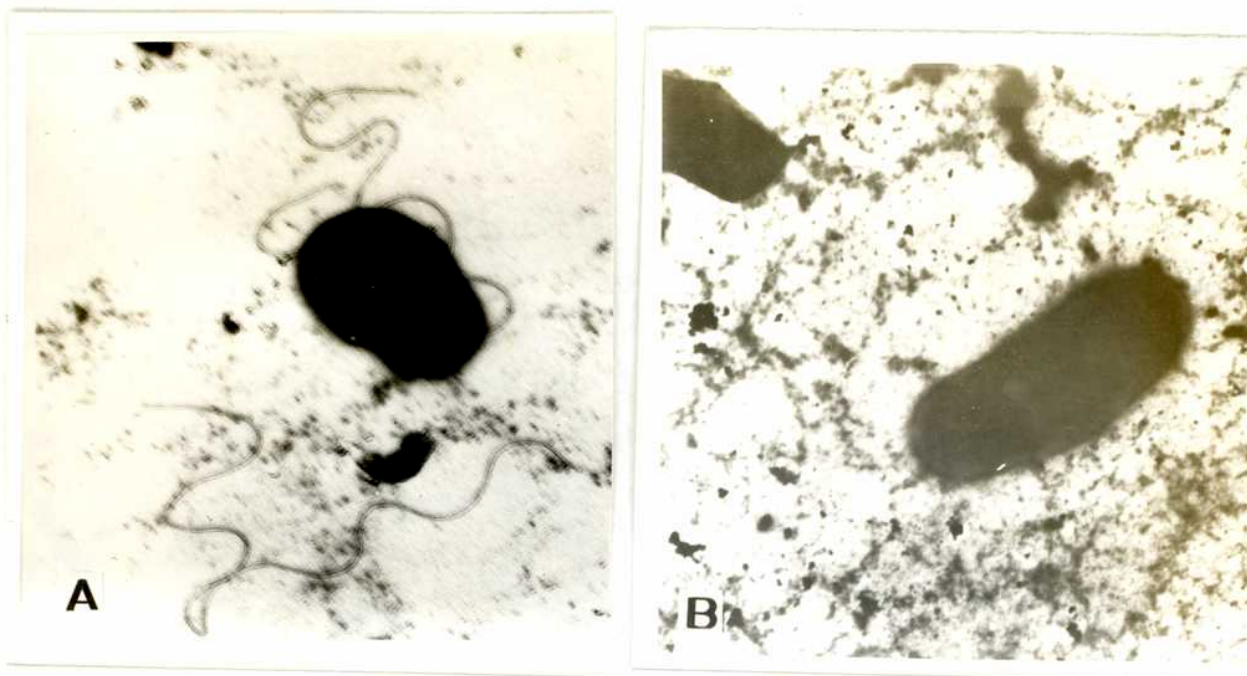


Figura 35) Microfotografía electrónica de células de *R. meliloti* GR4 y GRT21s. Cultivos de GR4 (A) y GRT21s (B) en medio líquido se procesaron y observaron en el servicio de microscopía electrónica del Departamento de Virología del INTA Castelar.

TABLA XIV

COMPARACION DE LAS CARACTERISITICAS FENOTIPICAS DE LAS MUTANTES ChvB Y NdvB.

	A.tumefaciens A348	A.tumefaciens A1011	R.meliloti GR4	R.meliloti GRT21s
Virulencia o infectividad	+	-	+	-
Unión a células vegetales.	+ ^a	- ^a	+ ^b	- ^b
Movilidad	+	-	+	-
Cantidad de exopolisacárido	+	++	+	++
Presencia de glucano $\beta(1-2)$ in vivo	+	-	+	-
Presencia de glucano $\beta(1-2)$ in vitro	+	-	+	-
Presencia de la pi235	+	-	+	-

^a Unión a células vegetales en cultivo.

^b Unión a raíces vegetales, este experimento fue realizado por A. Lagares (UNLP).

DISCUSION

Fenotipo de *R.meliloti* GRT21s.

Los estudios sobre *R.meliloti* GRT21s son de utilidad para aclarar algunos aspectos del proceso de nodulación y el rol de los polisacáridos. El aspecto más interesante de esta mutante fue su capacidad de inducir la formación de nódulos vacíos (pseudonódulos). Esta característica fenotípica se había descrito previamente en una familia de mutantes que no producían exopolisacárido (*Exo*⁻). De ellas sólo se estudió el proceso infectivo en mutantes de los grupos B y H^(44,83). Bacterias mutantes del grupo B se adhieren a la raíz, producen ramificaciones del pelo radicular, pero no inducen enrulamiento. Se las puede aislar de nódulos, pero no se encuentran dentro de la célula cortical, sino en los espacios intersticiales. En las mutantes *ExoH*, que producen un exopolisacárido no succinilado, está retrasada la formación de rulos y báculos de pastor. El hilo de infección formado no avanza más allá de la corteza del nódulo.

R.meliloti GRT21s se aisló de nódulos, pero al igual que las mutantes *ExoB*, esta presente solo en los espacios intercelulares⁽¹⁴¹⁾. A diferencia de las mutantes *Exo* es capaz de producir enrulamiento pero no báculo de pastor. Es probable que en esta mutante este defecto sea el responsable de la falta de invasión del nódulo. El fenotipo de esta mutante demuestra que, en la simbiosis *R.meliloti* alfalfa, el proceso de deformación del pelo radicular no depende de una única señal, que luego de ser emitida dispararía irreversiblemente el proceso infectivo, sino que la bacteria no sólo induce sino que también controla hasta su finalización dicho proceso para el que sería necesario la acción sincronizada de varios genes. La presencia de bacterias en espacios intercelulares puede deberse a la penetración por intersticios abiertos en el proceso de crecimiento de la raíz o durante la formación del pseudonódulo.

En contraste con las mutantes *Exo*⁻, la cepa GRT21s es aún más brillante en placas de Calcofluor que la cepa salvaje, debido a que sobreproduce exopolisacárido. Este polisacárido es normal en cuanto a peso molecular, y contenido de los sustituyentes estudiados. Otros autores han descrito para mutantes equivalentes resultados dispares respecto al contenido y constitución del exopolisacárido. El grupo de G. Ditta⁽³⁹⁾ publicó que en las mutantes *NdvB* la cantidad de exopolisacárido era normal, mientras que el grupo de Pühler⁽⁹⁸⁾ comunicó que otra mutante *NdvB* producía mayor cantidad de un exopolisacárido que carecía de piruvato. Ambos resultados no coinciden con lo encontrado en la mutante GRT21s. En nuestro laboratorio se observó también sobreproducción de exopolisacárido en mutantes *ChvB* de *A. tumefaciens*, y en una cepa salvaje de la misma especie cuando se cultiva en medios de alta osmolaridad que reprimen la síntesis de glucano β (1-2)⁽¹⁵⁹⁾. El exceso de exopolisacárido podría atribuirse a un aumento de la oferta de UDPGlc en la célula.

La mutante GRT21s no producía in vivo o in vitro glucano β (1-2). Estas características son idénticas a las descritas para las mutantes *ChvB* de *A. tumefaciens* que se resumen en la Tabla XIV.

En el próximo capítulo se presentan los estudios genéticos que demuestran que *R.meliloti* GRT21s es una mutante *NdvB*.

CAPITULO 3

COMPLEMENTACION DE *R. meliloti* GRT21s CON LAS REGIONES *chvB* y *ndvB*.

RESUMEN

Se introdujeron en *R.meliloti* GRT21s plásmidos conteniendo la región *chvB* o *ndvB*. En las cepas obtenidas se estudiaron las características fenotípicas. La presencia de cualquiera de estos plásmidos en GRT21s restituyó la movilidad, la formación de báculo de pastor e hilo de infección en pelos radiculares. La morfología de los nódulos resultantes resultó indiferenciable de los inducidos por la cepa salvaje, y fueron capaces de reducir acetileno. Estos resultados sugieren que *R.meliloti* GRT21s es una mutante NdvB.

INTRODUCCION

En el capítulo anterior se determinó que *R. meliloti* GRT21s era incapaz de sintetizar glucano β (1-2) debido a que carece de la *pi235*, es inmóvil por carecer de flagelo, y es incapaz de infectar pelos radiculares de alfalfa. Estas características fenotípicas son idénticas a las que presentan mutantes *ChvB* de *A. tumefaciens* (falta de *pi235*, falta de flagelo, y avirulencia). El fenotipo avirulento de estas últimas mutantes es asimilable a la incapacidad de invadir pelos radiculares de GRT21s. Por otra parte mutantes *NdvB* también forman pseudonódulos y son incapaces de formar hilo de infección⁽³⁷⁾. Estas observaciones sugerían fuertemente que GRT21s es una mutante *NdvB*. Para obtener evidencia del locus afectado en la mutante GRT21s, se introdujeron por conjugación plásmidos que contienen las regiones *chvB* o *ndvB*, y se estudiaron las características fenotípicas de las cepas obtenidas. Previamente otros grupos, habían complementado mutantes *ChvB* con el locus *ndvB*⁽³⁹⁾, lo que hacía suponer que genes de *A. tumefaciens* se expresarían en *R. meliloti*.

RESULTADOS

Plásmidos usados para complementar *R. meliloti* GRT21s.

Para realizar los estudios de complementación de GRT21s se utilizaron plásmidos que contenían las regiones *chvB* o *ndvB*.

El fragmento de DNA que contiene la región *chvB* es de 5 kb, y fue aislado de *A. tumefaciens* A348. Dicho fragmento juntamente con 4 kb provenientes de la región "upstream" al extremo 5', está clonado en el sitio BamHI del vector pTJS140 (que codifica la resistencia a carbenicilina). Este plásmido se denomina pRAR205⁽³⁴⁾ (Fig. 13). También se utilizó el cósmido pCD523⁽³⁴⁾, que contiene las regiones *chvB*, *chvA*, 3,8 kb entre ambas regiones, y regiones flanqueantes (Fig. 47 C). El fragmento de 3,8 kb es necesario para restituir la síntesis de la pi235.

El fragmento de DNA que contiene la región *ndvB* fue aislado de *R. meliloti* 102F34, y consiste en un fragmento EcoRI de 6,4 kb clonado en el vector pRK290⁽³⁹⁾ (que codifica la resistencia para tetraciclina) Este plásmido se denomina pTY12 y fue cedido gentilmente por el Dr. G. Ditta⁽³⁹⁾ (Fig. 47 C). Se utilizó también el plásmido p186 que contiene un fragmento Eco RI de 6,4 kb clonado en el vector pSUP102⁽⁹⁸⁾ (Fig. 36).

Los plásmidos se introdujeron en GRT21s mediante un sistema de conjugación triparental, en el cual GRT21s era la cepa receptora, la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido es la cepa dadora y la cepa pRK2013 de *E. coli* que lleva la región *tra* necesaria para la transferencia se la denomina "helper". En el caso del plásmido p186, no es necesaria la cepa "helper", ya que la cepa de *E. coli* que contiene al mismo posee la región *tra* en el cromosoma⁽¹²²⁾.

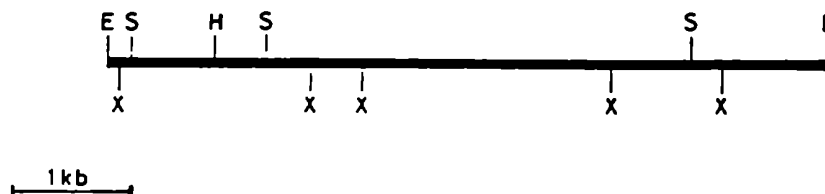


Figura 36) Organización del fragmento de DNA clonado en el p186 que complementa *R. meliloti* GRT21s⁽⁹⁸⁾. E: Eco RI, S: Sal I, X: Xho I, H: Hind III.

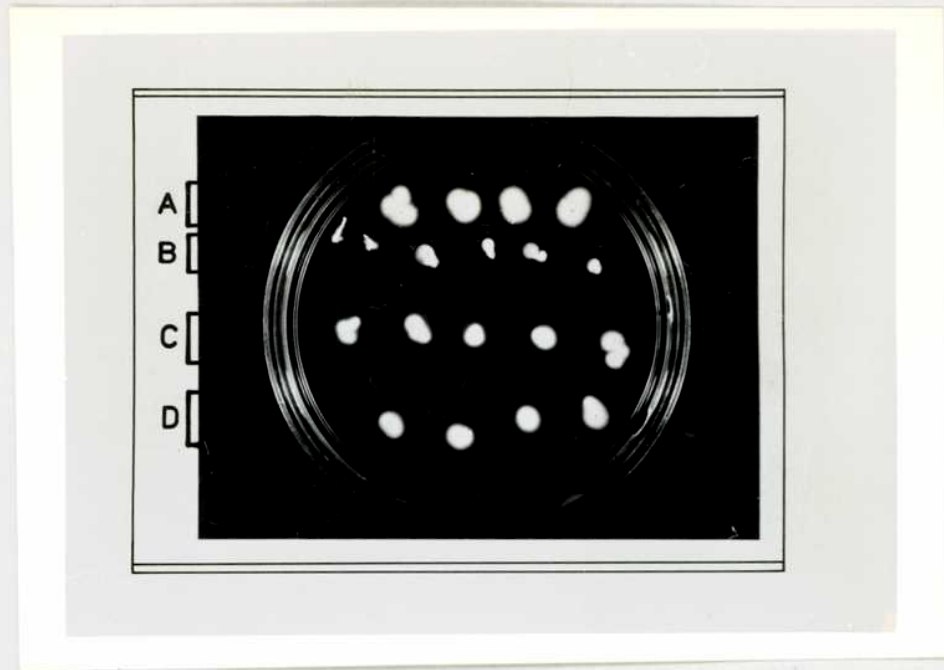


Figura 37) Movilidad de *R.meliloti* GR4 y GRT21s, SC1, y SC15. La movilidad de distintos clones de *R.meliloti* GR4 (A), GRT21s (B), SC1 (C), y SC15 (D) se determinó por cultivo en medio AMA suplementado con agar 0,35%, durante 48 hs a 28°C.

Movilidad.

En contraste con *Rhizobium meliloti* GRT21s las cepas complementadas con la región *chvB* o *ndvB* son móviles presentando halo de crecimiento alrededor del punto de siembra en agar semisólido (Fig. 37).

Formación de báculo de pastor, mancha hialina e hilo de infección.

Tal como se describió *Rhizobium meliloti* GRT21s es incapaz de formar báculo de pastor. El plásmido pRAR205 (*chvB*, cepa SC1) y el plásmido pTY12 (*ndvB*, cepa SC15) fueron capaces de restituir en la mutante la capacidad de formar báculo de pastor en alfalfa (Fig. 38 A,B). Se observó que una vez formado el mismo, el proceso continúa su desarrollo normal con la formación del hilo de infección (Fig. 38 C,D). Estos resultados sugieren que la incapacidad de *Rhizobium meliloti* GRT21s de formar un báculo de pastor correcto, sería el defecto primario que le impide llevar adelante el proceso infectivo.

Nodulación y reducción de acetileno

Al cabo de cuatro semanas las plantas inoculadas con las cepas SC1 y SC15 alcanzaron mayor tamaño que las inoculadas con la mutante (Fig. 39). Por otra parte, mientras los nódulos formados por la cepa mutante son redondos y blancos incapaces de reducir acetileno, las cepas SC1 y SC15 dieron lugar a la aparición de nódulos elongados (Fig. 40) y rosados en número similar a los formados por la cepa salvaje. Estos nódulos fueron capaces de reducir acetileno en cantidades equivalentes a la cepa salvaje.

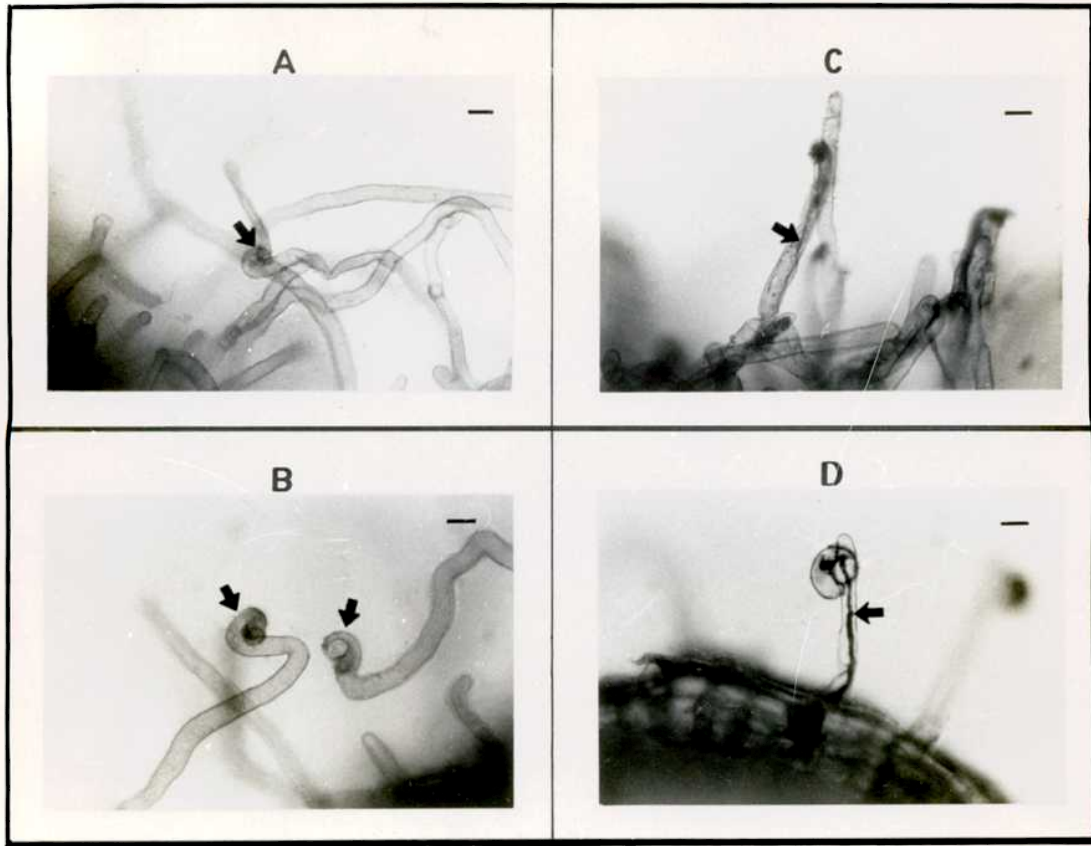


Figura 38) Deformación e infección de la raíz de alfalfa inducida por *R. meliloti*. Las raíces se inocularon y tiñieron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.
 A) Báculo de pastor (cabeza de flecha) inducido por la cepa SC1, B) Báculo de pastor (cabeza de flecha) inducido por la cepa SC15, C) Hilo de infección (flecha) inducido por la cepa SC1, y D) Hilo de infección (flecha) inducido por la cepa SC15. Barra 20 μm .

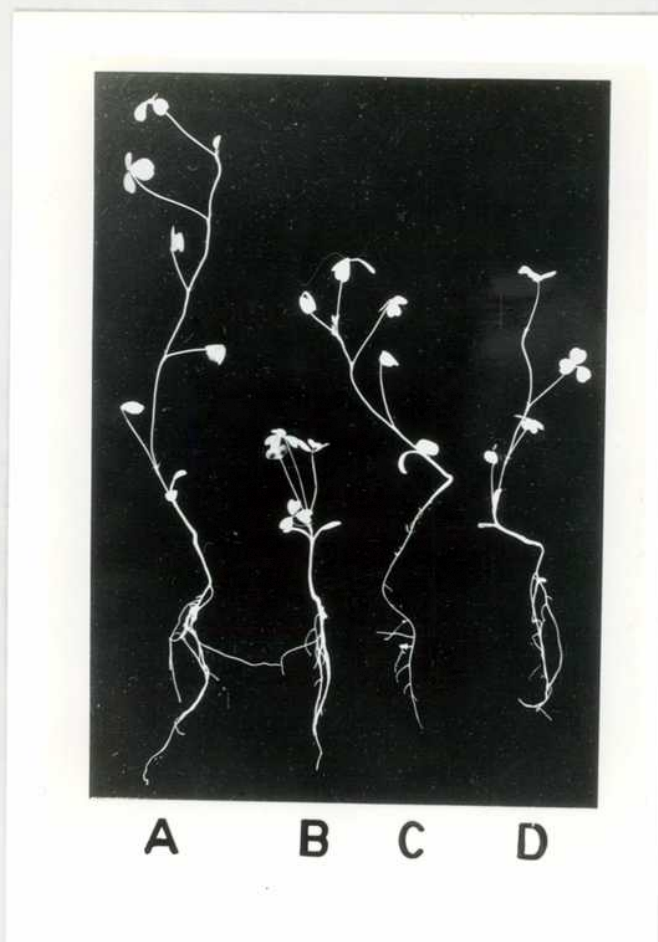


Figura 39) Plantas de alfalfa inoculadas con distintas cepas de *R. meliloti*. Las plantas de alfalfa se inocularon con las cepas GR4 (A), GRT21s (B), SC1 (C), y SC15 (D) de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. La fotografía se tomó luego de cuatro semanas de la inoculación.

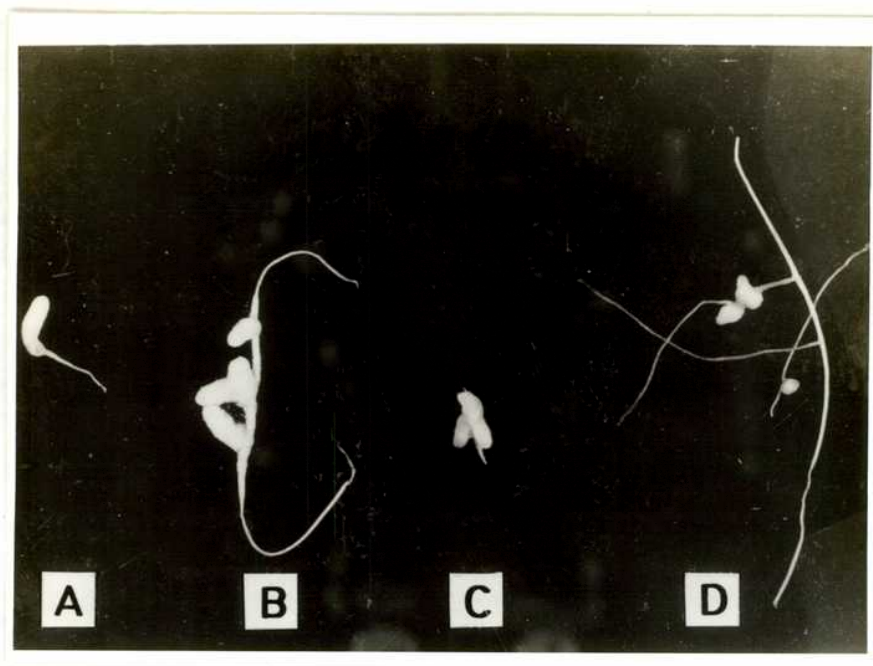


Figura 40) Nódulos formados por distintas cepas de *R. meliloti*. Cuatro semanas después de la inoculación con SC15 (A), SC1 (B), GR4 (C) y GRT21s (D) se separaron los nódulos formados y se fotografiaron.

Estudios realizados con las cepas TU1 y RAG1

La presencia de los plásmidos pCD523 (cepa RAG1) o p186 (cepa TU1) en GRT21s restituyó la movilidad y la formación de nódulos activos (datos no mostrados). Aunque no se estudió en detalle el proceso infeccioso, se supone que también se restituye la formación de báculo de pastor, mancha hialina e hilo de infección, requisitos necesarios para la formación de nódulos activos.

DISCUSION

Las cepas SC1 y SC15 son derivadas de *R.meliloti* GRT21s que poseen plásmidos que llevan las regiones *chvB* y *ndvB* respectivamente. Dichas cepas resultaron ser móviles en agar 0,4%, y también fueron capaces de inducir la formación de báculo de pastor. Una vez formada esta estructura el hilo de infección se desarrolla normalmente. La morfología de los nódulos formados fue idéntica a los inducidos por la cepa salvaje. Estos nódulos fueron capaces de reducir acetileno. Por lo tanto los plásmidos que contienen las regiones *chvB* y *ndvB* le restituyen a GRT21s las características fenotípicas de la cepa salvaje, indicando que la mutación de *R.meliloti* GRT21s está relacionada con el locus *ndvB*. El hecho de que sea posible complementarla con el locus *chvB* responsable de la síntesis del glucano β (1-2), indica que una vez restituida la presencia de este polisacárido se restituye el fenotipo salvaje. Estos resultados indican que la ausencia del glucano β (1-2) es la responsable del fenotipo observado en GRT21s, lo que extiende la importancia de este polisacárido más allá de lo observado en *A. tumefaciens*, y consolida la idea de que es esencial para el desarrollo de una interacción temprana con la célula vegetal.

Si bien no es posible descartar que exista otra mutación en GRT21s, es claro que la mutación complementada con los loci *ndvB* y *chvB* es la única que afecta las propiedades simbióticas de la mutante.

Otro hecho notorio, si bien previsible, fue que la complementación se logró con DNA proveniente de *A. tumefaciens*.

CAPITULO 4

RELACION DE LOS LOCI *chvB* y *ndvB* CON EL GRADO DE POLIMERIZACION DEL
GLUCANO β (1-2)

RESUMEN.

Se estudiaron los glucanos β (1-2) producidos in vivo e in vitro por una mutante NdvB de *R.meliloti* complementada con DNA de *A. tumefaciens* o *R.meliloti*. El grado de polimerización del glucano β (1-2) formado fue idéntico al formado por la cepa dadora del DNA. Cepas de *A. tumefaciens* con inserciones del transposón *Tn3HoHo1* "upstream" el locus *chvB* producen glucanos cuyos grados de polimerización resultaron ser idénticos al de la cepa salvaje ($K_{AV}=0,20$). Dichos resultados indican que las regiones *chvB* y *ndvB* dirigen el grado de polimerización del glucano β (1-2). El mapa tríptico de la proteína intermediaria de 235 KDa de *A. tumefaciens* es idéntico al de *R.meliloti*. Se analizaron las proteínas intermediarias producidas por las cepas complementadas. Una mutante NdvB complementada con el plásmido pRAR205 produjo una proteína intermediaria de 150, idéntica a la producida por una mutante ChvB complementada con el mismo plásmido. Las cepas SC15, TU1, y RAG1 produjeron proteína intermediaria de 235 KDa .

INTRODUCCION

Para la síntesis del glucano β (1-2) se requieren por lo menos: A) una glucosil transferasa β (1-2) que transfiera glucosa, del UDPGlc al polisacárido naciente; B) un aceptor sobre el cual construir la cadena glucosídica, que actuaría como intermediario; y C) una ciclasa, que cerraría la cadena.

El único componente identificado es el referido en B) que es una proteína de 235 KDa (π 235) presente en la membranas internas de *A. tumefaciens* y *R. meliloti*⁽¹⁶¹⁾. Esta proteína está ausente en las mutantes ChvB. No se conoce la naturaleza de los otros componentes, aunque existen evidencias indirectas que indicarían que todas las funciones estarían contenidas en la π 235. El grado de polimerización del glucano β (1-2) puede estar regulado por la glucosil transferasa, o por la ciclasa.

De la biosíntesis del glucano β (1-2) sólo se conoce hasta el presente el rol de la proteína intermediaria de 235⁽¹⁶¹⁾ KDa. No se realizaron aún estudios sobre las actividades de glucosil transferasa y de ciclasa. No se describieron aún mutantes de *A. tumefaciens* en las que estando presente la π 235 no se sintetice glucano β (1-2) in vivo e in vitro. Tampoco se han descrito cepas productoras de glucano β (1-2) lineal. Lo expuesto deja abierta la posibilidad de que las actividades de elongación y ciclación estén presentes en la π 235, su comprobación definitiva exige la purificación a homogeneidad del o los componentes responsables de la biosíntesis de este polisacárido. Una estrategia alternativa en la que converjen la bioquímica, la genética bacteriana, y la biología molecular puede, sin embargo, proporcionar respuestas parciales al problema. Ha sido descrito que el grado de polimerización de los glucanos β (1-2) de *Rhizobium* y *Agrobacterium* es diferente. Un estudio del grado de polimerización de los glucanos β (1-2) producido por mutantes de *R. meliloti* complementadas con DNA de *A. tumefaciens*, o viceversa, podría ser de utilidad para aclarar algunos aspectos de la biosíntesis de este polisacárido. En este capítulo se describen los resultados obtenidos con este tipo de experimentos.

RESULTADOS

Presencia del glucano β (1-2) en extractos celulares de las cepas SC1 y SC15.

Extractos de TCA 1% provenientes de las cepas SC1 y SC15 se sometieron a cromatografía en columnas de Bio-Gel P4 con el fin de determinar si se restituía la presencia del glucano β (1-2). En la Figura 41 se muestran los resultados obtenidos. En la cepa SC15 (*Rhizobium meliloti* GRT21s complementada con el locus *ndvB*, DNA de *R. meliloti*) se restituye la formación de un polisacárido con $K_{AV}=0,18$ (Fig. 41 B), ausente en la mutante. En la cepa SC1 (*R. meliloti* GRT21s complementada con el locus *chvB*, DNA de *A. tumefaciens*) se acumula un polisacárido de menor grado de polimerización ($K_{AV}=0,20$) (Fig. 41 D) idéntico al producido por la cepa salvaje de *A. tumefaciens* (Fig. 41 C). Estos polisacáridos se identificaron como glucanos β (1-2) mediante hidrólisis ácida total o parcial y posterior cromatografía de los productos obtenidos. Estos resultados indican que el tamaño del glucano formado está determinado por el DNA introducido.

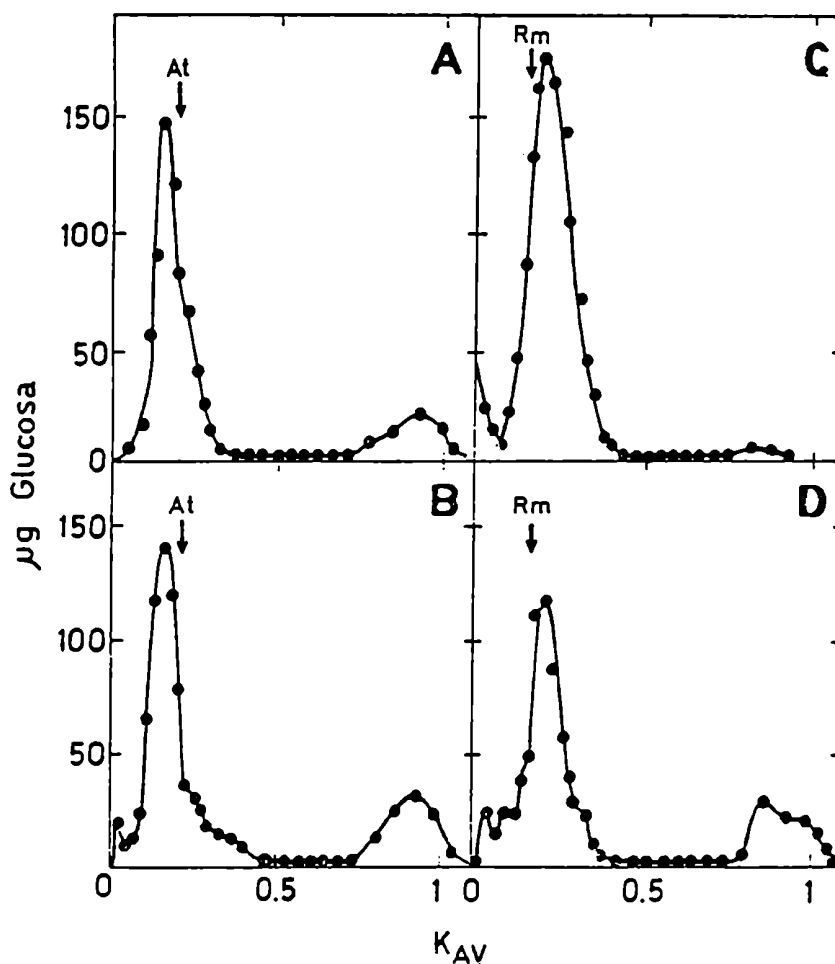


Figura 41) Polisacáridos presentes en extractos celulares de *R. meliloti* SC1 y SC15. Los extractos de TCA 1% se obtuvieron y sometieron a cromatografía en Bio Gel P-4 de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. El dosaje de azúcares se realizó por el método de la antrona. A) *R. meliloti* GR4, B) *R. meliloti* SC15, C) *A. tumefaciens* A348, y D) *R. meliloti* SC1. La flecha indica las

posiciones en que eluyen los glucanos β (1-2) acumulados in vivo por *A. tumefaciens* (At) y *R. meliloti* (Rm).

Síntesis in vitro del glucano β (1-2).

Los resultados descriptos en el apartado anterior indicaron que in vivo el K_{AV} del glucano β (1-2) producido por las cepas SC1 y SC15 es idéntico al de la cepa dadora del fragmento de DNA utilizado para su complementación. Para determinar si esta diferencia de K_{AV} era debida solamente al grado de polimerización, se preparó [^{14}C]glucano β (1-2) con membranas internas aisladas provenientes de esas cepas. Ha sido descripto que los glucanos β (1-2) sintetizados en estas condiciones no están sustituidos con restos no glicosídicos por lo que las diferencias en su tiempo de retención son debidas estrictamente a su grado de polimerización. Las preparaciones del polisacárido radioactivo se sometieron a cromatografía líquida de alta presión (Fig. 42), en presencia de un standard interno de [^3H]glucano β (1-2) producido por membranas internas de *A. tumefaciens*. En este sistema cromatográfico, este standard interno se separó en seis compuestos (Fig. 42 A y B SI). El de menor tiempo de retención (6 min), es de bajo peso molecular, y no fue caracterizado. Los otros compuestos que eluyeron con tiempos de retención de 40, 46, 53, 62, y 71 min corresponden a glucanos β (1-2) cuyos grados de polimerización son crecientes. El compuesto mayoritario fue el que eluyó con $\text{Tr}=46$ min, los compuestos que eluyeron con $\text{Tr}=40$ y 53 min se encontraban en menor cantidad. El polisacárido producido por membranas internas de la cepa SC1 (GRT21s+*chvB*) se comportó exactamente igual que el standard interno (Fig. 42 A panel superior). En cambio, en el glucano β (1-2) sintetizado por membranas internas de la cepa SC15 (GRT21s+*ndvB*) el compuesto mayoritario fue el que eluyó con $\text{Tr}=62$ min (Fig. 42 B panel superior). En menor proporción se sintetizaron los compuestos que eluyeron con $\text{Tr}=46$, 53 y 71 min, mientras que la síntesis del compuesto de $\text{Tr}=40$ min fue muy baja. Este experimento demuestra que la cepa SC1 sintetiza glucanos β (1-2) cuyas especies mayoritarias tienen menor grado de polimerización que los sintetizados por la cepa SC15. Ya se ha descripto previamente (capítulo 2) que los glucanos β (1-2) sintetizados in vitro por *R. meliloti* son de mayor grado de polimerización que los producidos por *A. tumefaciens*. Se concluye que el grado de polimerización esta determinado por los plasmidos pRAR205 (DNA de *A. tumefaciens*) y pTY12 (DNA de *R. meliloti*).

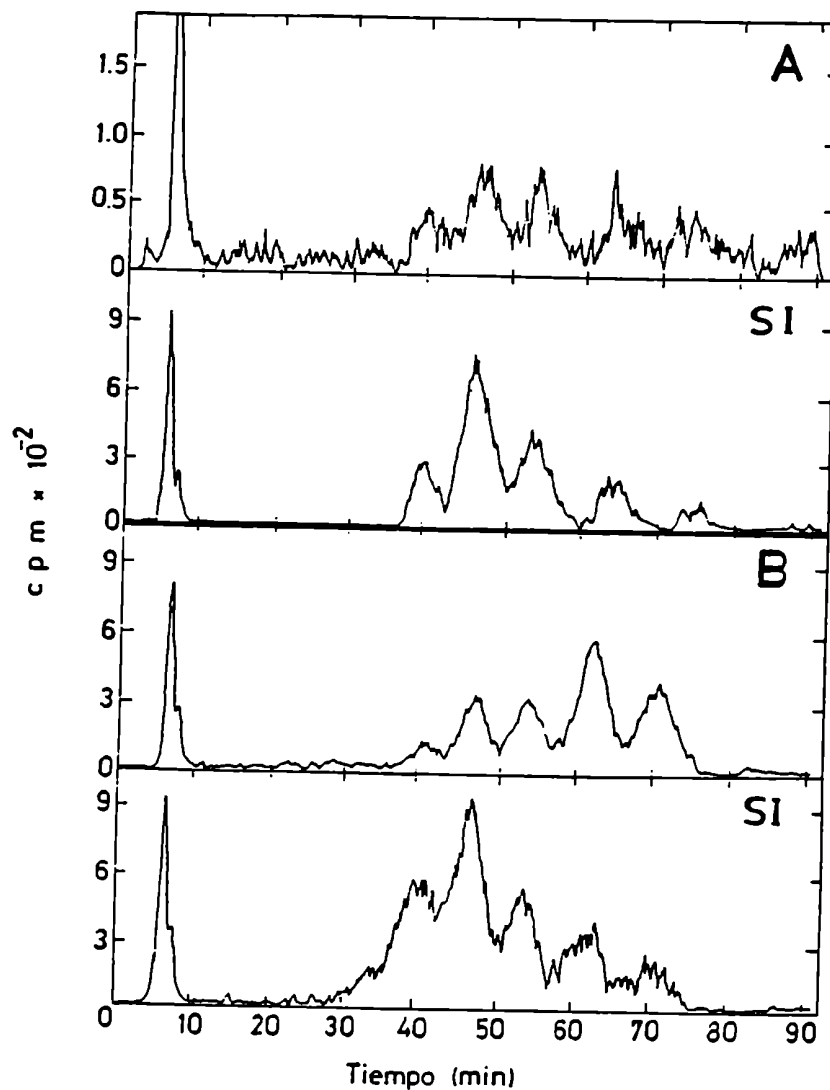


Figura 42) Polisacáridos sintetizados *in vitro* por membranas internas de *R. meliloti* SC1 y SC15. Las fracciones neutras de *R. meliloti* SC1 (A, arriba), y SC15 (B, arriba) se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los extractos neutros se sometieron a cromatografía líquida de alta presión a través de una columna Carbohydrate Analysis Lichrosorb-NH₂, desarrollada a 1 ml/min con acetonitrilo H₂O [65:35]. La radioactividad se determinó con un contador de radioactividad de flujo. La parte inferior de ambos paneles (SI) corresponde a un standard interno de [³H]glucano β (1-2) producido por *A. tumefaciens* A348.

Glucano β (1-2) presentes en extractos celulares de las cepas ME41, ME43, y ME72.

Como ya se mencionó previamente el plásmido pRAR205 contiene un fragmento de DNA que abarca la región *chvB* y 4 kb "upstream" a ella. La región que determina el grado de polimerización bien podría haber sido esta última. De haber sido así, el K_{AV} del glucano β (1-2) sintetizado por cepas con inserciones del transposón *Tn3HoHo1* en esa región debiera haber sido anómalo. Para verificar esto se prepararon extractos TCA 1% de células de las cepas ME41, ME43, y ME72 (Fig. 13). Dichos extractos fueron sometidos a cromatografía en Bio Gel P-4. Como se observa en la Fig. 43, la cepa ME72 produce glucano β (1-2) del mismo grado de polimerización que una cepa salvaje de *A. tumefaciens*. Las cepas ME41 y 43 producen el mismo glucano que la cepa ME72 (datos no mostrados). Estas inserciones no afectan el grado de polimerización del glucano que sigue siendo típico de *A. tumefaciens*, por lo tanto esta región de DNA no contiene información que afecte el grado de polimerización del glucano β (1-2).

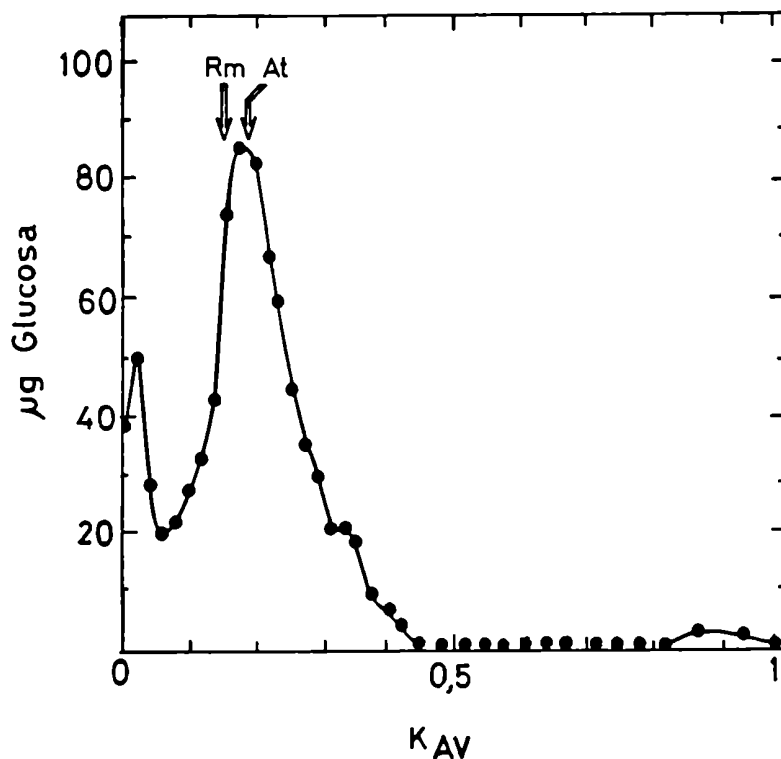


Figura 43) Polisacáridos presentes en extractos celulares de *A. tumefaciens* ME72, ME41, y ME43. El extracto TCA 1% de la cepa ME72 se obtuvo y sometió a cromatografía en Bio Gel P-4 de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. El dosaje de azúcares se realizó por el método de la antrona. La flecha indica las posiciones en que eluyen los glucanos β (1-2) acumulados in vivo por *A. tumefaciens* (At) y *R. meliloti* (Rm).

Tratamiento de las membranas internas de *R. meliloti* con tripsina.

De acuerdo con lo descrito anteriormente el locus *chvB* en *A. tumefaciens* y su homólogo *ndvB* en *R. meliloti* son responsables del grado de polimerización del glucano β (1-2) formado. Dichos loci codifican para la proteína intermediaria de 235 kDa, por lo que el grado de polimerización parece depender de esta proteína. Los mapas de restricción del DNA de estos dos loci son distintos, por lo que es posible suponer que las pi235 de ambas especies son distintas en cuanto a estructura primaria. Para tratar de determinar esto último, se trataron las membranas internas de *R. meliloti* con tripsina, los productos formados se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior fluorografía. Como se muestra en la Fig. 44 no se observa ninguna diferencia, sugiriendo que ambas proteínas son idénticas o muy similares.

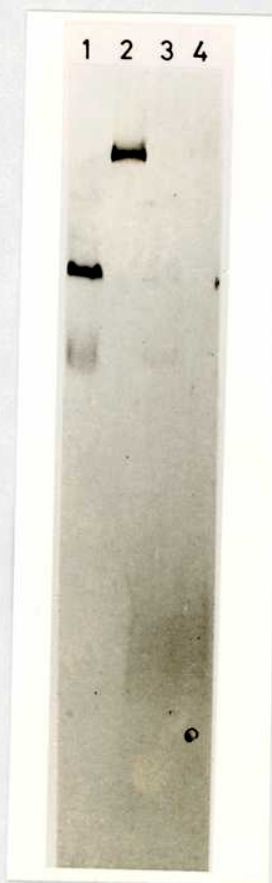


Figura 44) Polipéptidos originados por tratamiento con tripsina de membranas internas de *R. meliloti* y *A. tumefaciens*. Las membranas internas de cepas salvajes de *R. meliloti* (carriles 1 y 2) *A. tumefaciens* (carriles 3 y 4), fueron incubadas de acuerdo a lo indicado en la Fig. 22, pero se omitió el chase. La radioactividad se detectó por fluorografía. Carriles pares, el SBTI Y UDP[¹⁴C]Glc se agregaron al principio junto con la tripsina, en los carriles impares se agregaron luego de incubar 5 min con tripsina.

La cepa SC1 produce una proteína intermediaria de 150 kDa.

El plásmido pRAR205 codifica en *A. tumefaciens* para una proteína intermediaria de 150 kDa. Se realizaron estudios para determinar que proteína intermediaria se obtenía cuando este plásmido se introduce en *R. meliloti*. Se incubaron membranas internas de la cepa SC1 con

UDP[¹⁴C]Glc, y los productos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. Luego de tinción con Coomassie Blue no se observó ninguna proteína cuyo tamaño correspondiera a la pi235 (Fig. 45 A). La fluorografía reveló que la radioactividad insoluble en TCA 10% estaba asociada a una proteína cuyo peso molecular aparente era de 150 KDa. (Fig. 45 B). La radioactividad disminuyó cuando se añadió UDPGlc no radioactivo al medio de incubación (Fig. 45 B). indicando que, como en *A. tumefaciens*, se comporta como un intermediario. Cuando el plásmido se introdujo en la cepa salvaje (GR4, pRAR205, cepa SC6), se encontró que ésta produce tanto la pi235 como la pi150. Estos resultados indican que la pi150 está codificada en el pRAR205, y se transcribe del mismo plásmido, sin necesidad de recombinación.

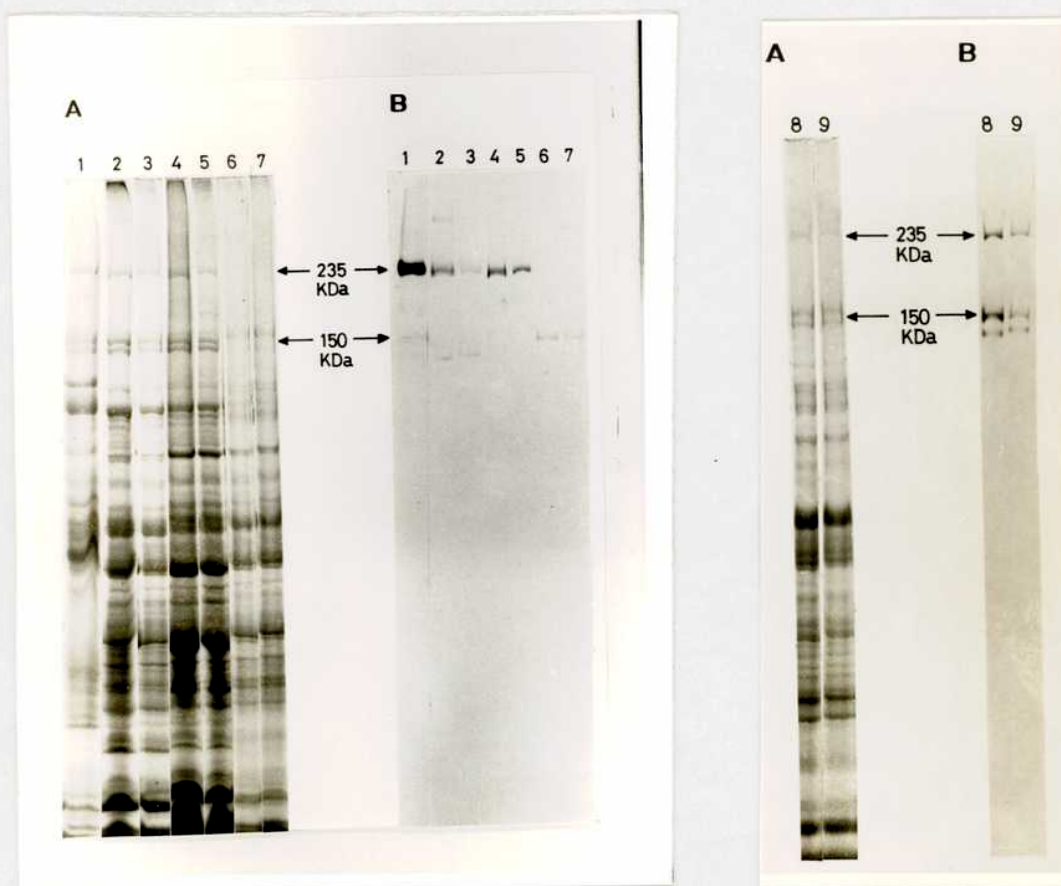


Figura 45) Proteína intermediaria presente en membranas internas de *R. meliloti* SC1 y SC 15. La fracción insoluble en TCA 10% proveniente de la incubación de las membranas internas con de UDP[¹⁴C]Glc se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida. A) Tinción con Coomassie Blue, B) Fluorografía. *A. tumefaciens* (carril 1, pulso); *R. meliloti* GR4 (carriles 2 y 3); SC15 (carriles 4 y 5); SC1 (carriles 6 y 7) y *R. meliloti* SC6 (carriles 8 y 9), los carriles pares corresponden al pulso, los impares al chase.

Proteínas intermediarias producidas por las cepas SC15, TU1, Y RAG1.

Las membranas internas de las cepas SC15, TU1, y RAG1 se incubaron con UDP[¹⁴C]Glc. La fracción insoluble en TCA 10% se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida. En todas estas cepas la radioactividad se encontró asociada a una proteína que corresponde a la pi235 (Fig. 45 y 46). Luego del agregado de UDPGlc no radioactivo la radioactividad disminuyó, indicando que estas proteínas se comportan como intermediarias.

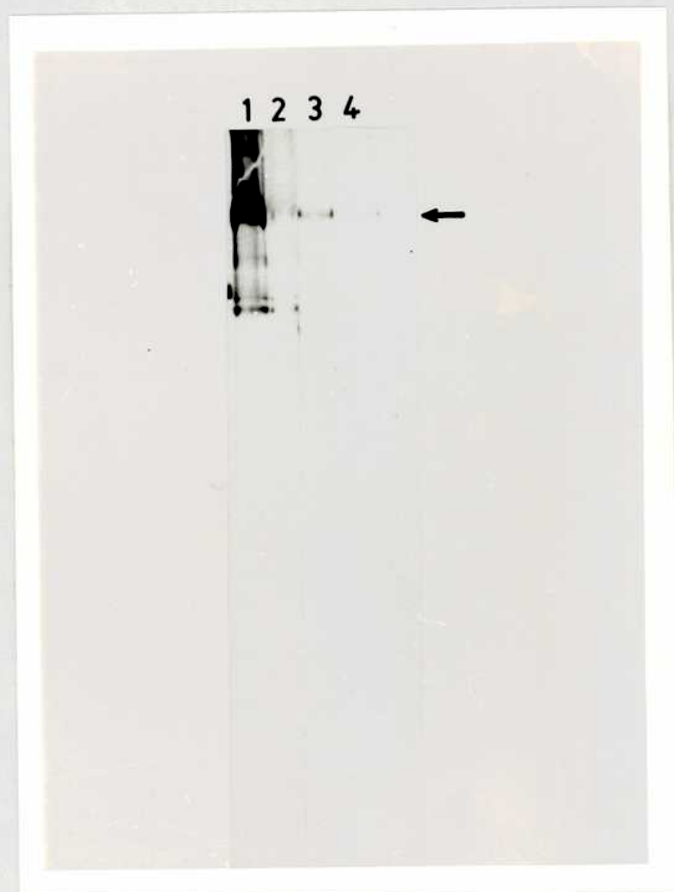


Figura 46) Proteínas intermediarias presentes en membranas internas de *R. meliloti* TU1 y RAG1. La fracción insoluble en TCA 10% provenientes de la incubación de membranas internas de *R. meliloti* RAG1 (carriles 1 y 2) y TU1 (carriles 3 y 4) con UDP[¹⁴C]Glc se sometió a electroforesis en gradiente de poliacrilamida. La radioactividad se detectó por fluorografía. Los carriles impares corresponden al pulso, los pares al chase.

DISCUSION

Los glucanos β (1-2) son producidos por los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*. Estos glucanos están sustituidos con grupos ácidos^(64,94,96). El grado de polimerización difiere con la especie. *A. tumefaciens* y *R.meliloti* son los que producen glucanos de mayor tamaño, y entre ellos los de *R.meliloti* son mayores a los de *A. tumefaciens*. Los glucanos β (1-2) sintetizados in vitro por *R.meliloti* son mayores que los producidos en las mismas condiciones por *A. tumefaciens*. Esto sugiere que la diferencia de tamaño de los glucanos obtenidos in vivo es debida a las diferencias observadas in vitro. Si bien los glucanos sintetizados in vitro no están sustituidos, no se puede descartar en forma absoluta que el glucano β (1-2) producido por *R.meliloti* no haya sufrido alguna modificación que resulte en un aumento del peso molecular aparente.

En este capítulo se demostró, que el tamaño del glucano β (1-2) depende del origen de la proteína intermediaria, ya que el grado de polimerización del glucano β (1-2) producido por la cepa de *R.meliloti* complementada con DNA de *A. tumefaciens* (SC1) corresponde al producido por la cepa de *A. tumefaciens* de la que se extrajo el DNA. Por el contrario, esa misma mutante complementada con DNA de *R.meliloti* produce glucano β (1-2) cuyo grado de polimerización corresponde al de *R.meliloti*. Ya que las regiones *ndvB* y *chvB* codifican para la pi235, esto indicaría que o bien las proteínas intermediarias son distintas, o bien su inserción en la membrana es distinta, y esto afecta el glucano formado. Es de destacar que los mapas de restricción de ambas regiones son distintos, sin embargo el tratamiento de las pi235 de *R.meliloti* y *A. tumefaciens* con tripsina no permitió detectar la supuesta diferencia.

Por lo expuesto hasta ahora se deduce que el grado de polimerización del glucano β (1-2) lo determina la pi235, y que la región amino terminal contenida en la pi150 no sólo es suficiente para la síntesis del glucano β (1-2), sino que contiene la información necesaria para determinar el grado de polimerización. Por otra parte los datos indican que existiría una región de 1 kb "upstream" el gen de la pi235, dentro del locus *chvB*, que se halla fuera del gen estructural de la pi235 pero que se requiere para su síntesis.

El hecho de que la cepa SC1 (GRT21s,pRAR205) produzca la pi150 indica que el gen de *A. tumefaciens* se expresa en *R.meliloti*, sin que requiera recombinación. Esto se verifica por el hecho de que la cepa SC6 (GR4,pRAR205) produce la pi235 y la pi150. La cepa RAG1 (GRT21s,pCD523) produjo una proteína intermediaria de igual tamaño que la producida por la cepa salvaje. Esto es previsible ya que en este cósmido se encuentra completo el gen que codifica por la pi235.

Los resultados imprevistos obtenidos con las cepas SC15 y TU1 en relación a que en ellas se observaron proteínas intermediarias de 235 kDa, sólo pueden ser explicados por recombinación, tal como se discutirá en capítulo 5.

RESUMEN

Se identificó la zona *ndvB* de *R.meliloti* GR4 utilizando sondas de la región *chvB* de *A. tumefaciens*. La homología se extiende por lo menos 1,2 kb "downstream" la región *ndvB*. Ya que *R.meliloti* GRT21s se complementa por recombinación con un fragmento Eco RI de 6,4 kb proveniente de *R.meliloti* 102F34 o 1021, la mutación responsable de su fenotipo se encuentra en ese fragmento. Sin embargo no se observaron diferencias de tamaño entre fragmentos de DNA provenientes de esa zona de las cepas GR4 y GRT21s.

INTRODUCCION

R.meliloti GRT21s es una mutante que forma nódulos vacíos en alfalfa, es inmóvil, y carece de glucano β (1-2) debido a que las membranas internas no poseen la proteína de 235 KDa necesaria para su síntesis. Se complementó con plásmidos que contenían la región *chvB* de *A. tumefaciens* o *ndvB* de *R.meliloti*, sugiriendo que la mutación primaria se encuentra en el locus *ndvB*. Para caracterizar la mutación es necesario definir su localización y el tipo de alteración (delección, cambio de bases, etc). Debido al método utilizado para obtener la mutante, se pensó que podría tratarse de una delección.

La homología existente entre la región *chvB* de *A. tumefaciens* y su equivalente en *R.meliloti* fue estudiada por otros autores utilizando como sonda un fragmento que abarcaba 1/5 de la región *chvB*⁽³⁹⁾. De acuerdo a los resultados presentados en esta tesis, en *A. tumefaciens* la región comprendida entre los loci *chvA* y *chvB* codifica por el extremo carboxi-terminal de la p235. Por esta razón y en virtud de que en *R.meliloti* se desconocía si esta región era homóloga a su equivalente en *A. tumefaciens*, se realizaron estudios que se describen en este capítulo en cuanto a homología entre ellas.

Para obtener respuesta a las preguntas planteadas se realizaron experimentos de hibridización entre DNA de GR4 o GRT21s con sondas provenientes de distintas zonas de la región *chvB*.

RESULTADOS.

Sondas utilizadas.

Se utilizaron 3 sondas. Sonda A: se obtuvo por digestión del plásmido pRAR205 con las enzimas de restricción Bam H1 y Cla1. El fragmento aislado de 4,2 kb abarca, 3,2 kb del extremo 5' del locus *chvB* y 1 kb "upstream" a dicho locus (Fig. 47 A). Sonda B: consistió en un fragmento de 2,3 kb proveniente de la digestión del plásmido pRAR205 con la enzima Bam H1; cubre la región 3' del locus *chvB* (Fig. 47 A). Sonda C: es un fragmento de DNA de 3,2 kb proveniente de la digestión del cósmido pCD523 con la enzima Eco R1. Esta sonda abarca 1,2 kb del extremo 3' del locus *chvB* (superponiéndose a la sonda B) y 2 kb de la región "downstream" a dicho locus (Fig. 47 A).

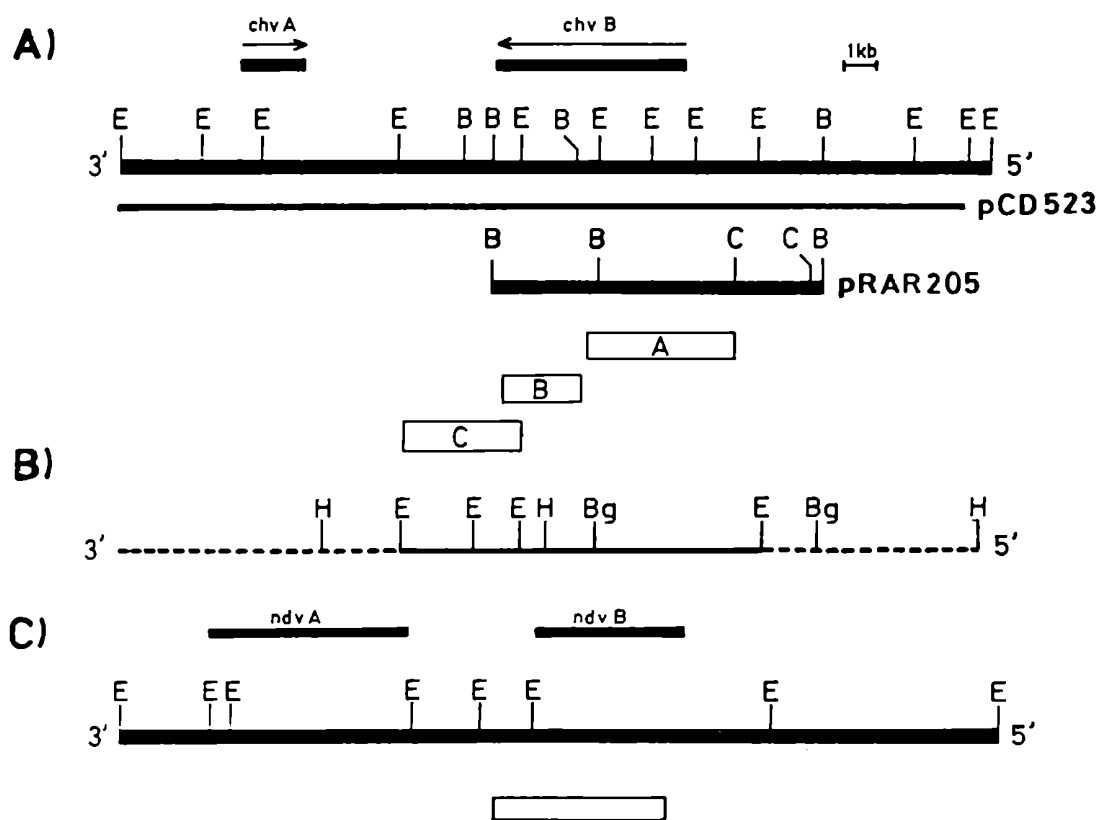


Figura 47) Estructura y organización de la región *ndvB* de *R. meliloti* GR4. A) Estructura de las regiones *chvA* y *chvB*, pCD523, y pRAR205. Las cajas vacías A, B, y C corresponden a las probes usadas. B) Estructura y organización de la región *ndvB* de *R. meliloti* GR4. Se obtuvo por hibridación de las sondas descritas en el panel A) con digestos de DNA total de *R. meliloti*. C) Estructura y organización de las regiones *ndvA* y *ndvB* de *R. meliloti* 102F34. La barra vacía corresponde al fragmento de DNA que codificaría una pi150. B: BamH1, Bg: Bgl II, C: ClaI, E: Eco RI.

Mapa de restricción de la zona homóloga a la región *chvB* en *R.meliloti* GR4.

Sobre la base del patrón de hibridización obtenido cuando el DNA de GR4 se digirió con la enzima Eco RI y se hibridizó con las distintas sondas, se confeccionó el mapa mostrado en la Fig. 47 B. El mismo ha sido alineado con el correspondiente al locus *chvB*. Para esta enzima de restricción la sonda A hibridizó con un fragmento de 6,4 kb; la sonda B con dos fragmentos uno de 6,4 y otro de 1,3 kb; y la sonda C con uno de 1,3 y otro de 1,8 kb. Asumiendo una organización genética similar entre las distintas cepas de *R.meliloti* para la región *ndvB* se alinearon los fragmentos homólogos de GR4 en la forma que se muestra en la Fig. 47 B (6,4-->1,3-->1,8). Es destacable la coincidencia del tamaño de la suma de las sondas y la región homóloga de GR4.

El mapa obtenido usando DNA total de GRT21s fue exactamente el mismo, que el de GR4. Los fragmentos Eco RI de 1,8 y 1,3 kb no presentaron diferencias de tamaño. No existen dentro de ellos sitios de corte para las enzimas usadas. En cuanto al fragmento EcoRI de 6,4 kb, aparenta tener el mismo tamaño que el obtenido de GR4 (Fig. 48 A), pero si la delección fuera pequeña no sería posible detectarla. En este fragmento existen dos sitios, uno para Hind III, y otro para Bgl II. Para verificar si la delección estaba en estos fragmentos, se realizaron digestiones dobles de DNA de GR4 y GRT21s con Eco RI y Hind II o Bgl II. El DNA digerido se sometió a electroforesis, se transfirió, e hibridizó con las sondas A y B (Fig. 48). Cuando la digestión se realizó con las enzimas Eco RI y Hind III, se observó que la sonda A hibridizaba con dos fragmentos de DNA, uno de 5.5 kb y otro de aproximadamente 0,9 kb, mientras que la sonda B lo hacía con el fragmento de 0,9 y otro de 1,3, todos ellos presentes en ambas cepas. Cuando se utilizaron las enzimas Eco RI y Bgl II. se encontró que la sonda A hibridizaba con un fragmento de 5 kb, y otro de 2 kb, mientras que con la sonda B lo hacía con uno de 2 kb y otro de 1,3 kb. En ningún caso se observó diferencia entre el tamaño de los fragmentos entre la cepa mutante y la salvaje.

En trabajos realizados por el grupo de Helinsky se clonó la zona cromosomal relacionada con el locus *ndvB* de *R.meliloti* 102F34⁽³⁹⁾. Dicha zona se muestra en la Fig. 47 C, y se encontró por hibridización con una sonda de la región *chvB* que contiene un fragmento Eco RI de 1,25 kb (Fig. 47 A). La región funcional se definió por mutagenesis con el transposón *Tn5*. Estos autores definieron 3 fragmentos de DNA del mismo tamaño, y ubicados en el mismo orden que los descritos en esta tesis para GR4. Estos autores limitaron la zona *ndvB* al sitio marcado en la Fig. 47 C con una barra llena, que corresponde al 66,6% del fragmento de 6,4 kb. El comienzo de la zona *ndvB* de GR4 definido con las sondas utilizadas, coincide con el definido para 102F34.

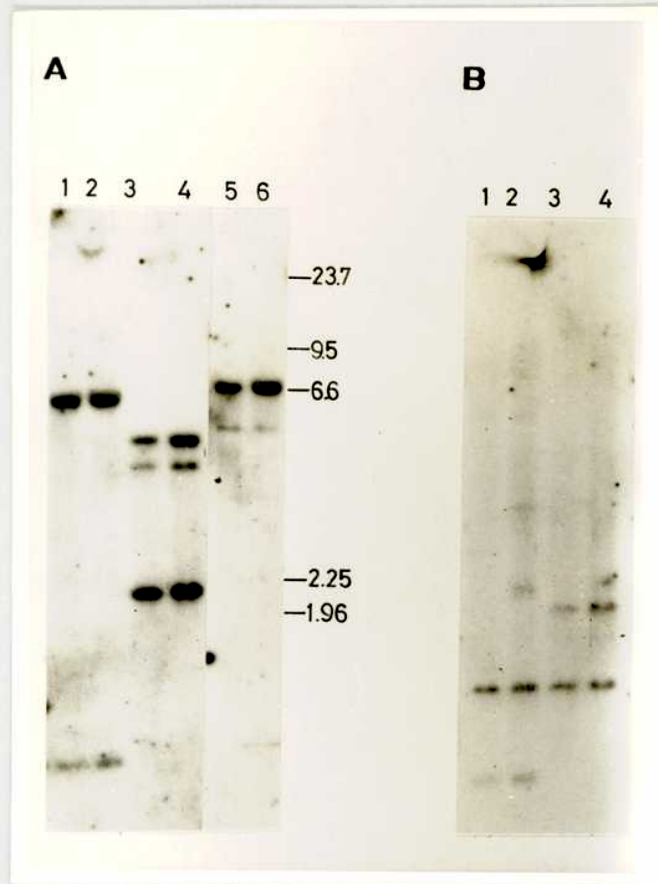


Figura 48) Hibridación de digestiones de DNA cromosomal de las cepas GR4 y GRT21s con distintas sondas de la región *chvB*. El DNA cromosomal de GR4 (carriles pares) y GRT21s (carriles impares) se trató como se describe en Materiales y Métodos. La radioactividad que hibridizó con el DNA cromosomal se visualizó por fluorografía. Panel A: sonda A, Panel B: sonda B.

Carriles 1 y 2: El DNA fue digerido con Eco RI/Hind III.

Carriles 3 y 4: La digestión se realizó con Eco RI/Bgl II.

Carriles 5 y 6 (sólo en panel A): La digestión se realizó con Eco RI.

Mecanismo de la complementación de *R. meliloti* GRT21s con los plásmidos pTY12 y p186.

En los mapas de restricción mostrados en la Fig 46. se puede observar que para obtener una proteína intermediaria activa (es decir mayor o igual a 150 kDa), es necesario un fragmento de DNA que contenga los fragmentos de 6,4 y 1,3 kb originados por digestión con Eco R1 (Fig. 47 C). Esto indicaría que el plásmido pTY12 no contiene la información suficiente para codificar por una proteína intermediaria activa. Sin embargo, cuando este plásmido es utilizado para complementar a la mutante GRT21s (cepa SC15) se obtuvo una proteína de 235 KDa. La única explicación posible es que se haya producido una recombinación entre la región clonada y su homóloga en el cromosoma.

Los intentos para complementar la mutante ME103 de *A. tumefaciens* (Fig. 13) con el plásmido pTY12 resultaron negativos, indicando que el fragmento de DNA contenido en el plásmido no cubre la región mutada

El plásmido p186 que contiene un fragmento de 6,4 kb. cuyo mapa de restricción publicado es idéntico al del fragmento presente en el pTY12 (L. Ielpi, comunicación personal), complementa la mutante GRT21s formando una pi235. Este fragmento está clonado en el vector pSUP102⁽⁹⁸⁾. Dicho

vector es un plásmido movilizable, pero no replicativo en *R. meliloti*. Por esto último, la única manera de obtener una cepa transconjugante resistente al antibiótico (codificado en el plásmido) es que ocurra una recombinación por simple crossing-over" (Fig. 49)⁽¹²²⁾. La única manera de obtener la formación de una proteína intermediaria completa es que haya ocurrido la recombinación. La única restricción que debe cumplirse para obtener la complementación es que el sitio de recombinación haya estado "upstream" de la región mutada.

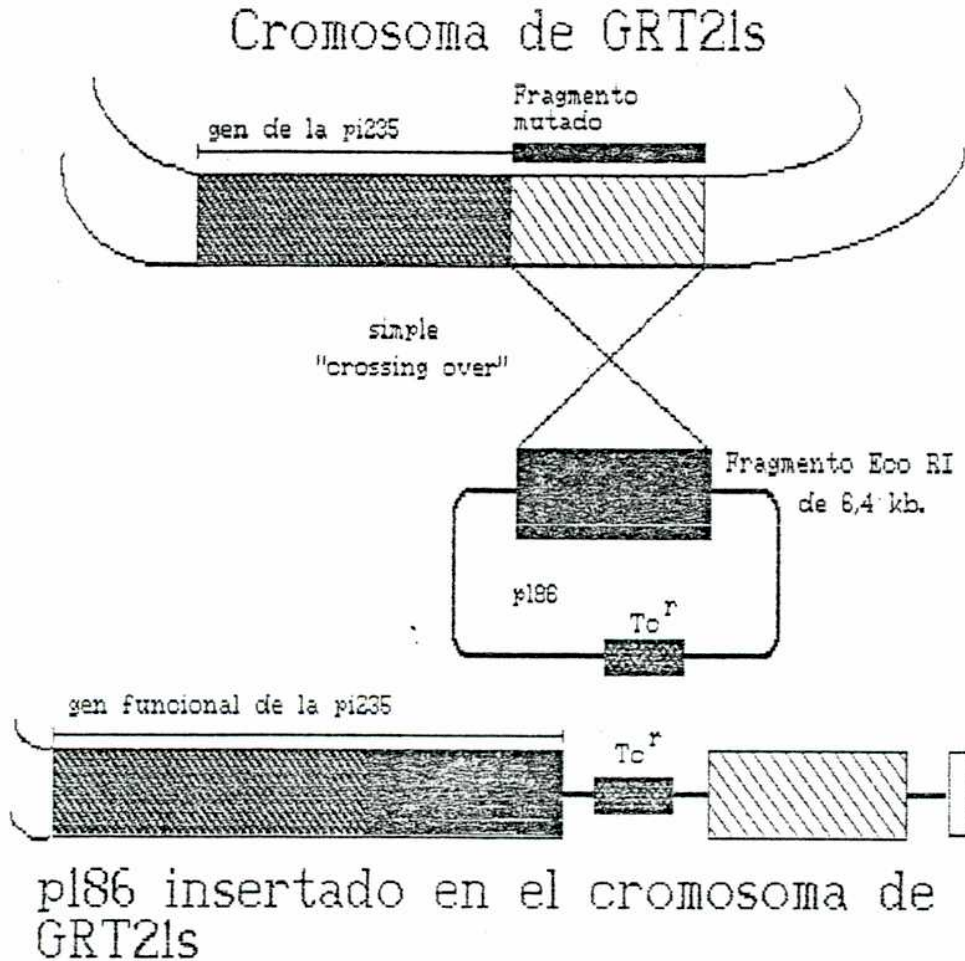


Figura 49) Simple "crossing over" mediante el cual el p186 queda insertado en el cromosoma de GRT21s.

DISCUSION

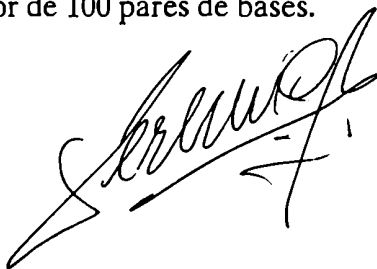
Durante este trabajo de tesis no se observó ninguna revertante de la mutante GRT21s, aún usando un método de selección tan poderoso como el efecto nodulatorio. Esta observación favorece la hipótesis de que la mutación no sea puntual. Por otra parte el tratamiento con altas temperaturas es usado para eliminar los megaplásmidos de especies de la familia *Rhizobiaceae* y puede generar deleciones. Estudios previos habían indicado que en esta cepa estaban presentes los mismos megaplásmidos que en la cepa salvaje (GR4). Debido a eso, era esperable que se tratara de una deleción. Sin embargo, no se pudieron detectar diferencias en el tamaño de los fragmentos de restricción entre las cepas GR4 y GRT21s. Esto indicó que, de tratarse de una deleción, ésta debe ser muy pequeña para ser detectada por el método utilizado.

Debido a que la complementación de GRT21s se obtuvo con el fragmento de 6,4 kb presente tanto en el plásmido pTY12 como en el p186, se puede afirmar que en esta cepa la mutación se encuentra en este fragmento. Este fragmento presenta un sitio de Hind III a 0,8 kb del extremo vecino al fragmento de 1,3 kb; y otro de Bgl II distante 2 kb del mismo punto (Fig. 45 B). Los resultados obtenidos por doble digestión no revelan diferencia en el tamaño de estos fragmentos, a pesar de que se encuentran en la zona de separación óptima del gel, por lo que si hubiera una deleción ésta debería ser menor a 50-100 bases que es el límite de resolución del sistema utilizado. Ensayos realizados por hibridización del DNA total de las cepas salvaje y mutante, y posterior digestión con nucleasa S₁, no fueron exitosos.

De acuerdo a datos de secuenciación en el fragmento de 6,4 kb se encontró un marco de lectura abierta en el mismo sentido que el observado en *A. tumefaciens*. En dicho marco de lectura no se encontró codón de terminación (L. Ielpi, comunicación personal). Estos resultados son previsibles si consideramos que el gen de la pi 235 se extiende por lo menos 4,5 kb "downstream" el locus *ndvB* definido por el grupo de Helinsky, tal como lo demuestran los resultados obtenidos en esta tesis.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1) El gen estructural de la proteína intermediaria de 235 KDa está contenido parcialmente en el locus *chvB* y *ndvB*.
- 2) El grado de polimerización del glucano β (1-2) está determinado exclusivamente por la proteína intermediaria de 235 KDa.
- 3) La actividad enzimática y biológica de la proteína intermediaria de 235 KDa está contenida en un fragmento de 150 KDa correspondiente al extremo NH₂ terminal.
- 4) En dicho fragmento está contenida la información que determina el grado de polimerización del glucano β (1-2),
- 5) El gen estructural de la proteína intermediaria de 235 KDa comienza en *A. tumefaciens* a 1,1 kb downstream el extremo 5' de la región *chvB* y se extiende 4,1 kb downstream de dicha región.
- 6) Se encontró que una mutante de *R.meliloti* (GRT21s) aislada previamente y que forma pseudonódulos en alfalfa no sintetiza glucano β (1-2) por carecer de la proteína intermediaria de 235 KDa.
- 7) En la mutante GRT21s la mutación se encuentra en el locus *ndvB*, homólogo al locus *chvB* de *A. tumefaciens*.
- 8) La mutante *ndvB* de *R. meliloti* se complementó con la región *chvB* de *A. tumefaciens*.
- 9) El fenotipo avirulento de las mutantes ChvB de *A. tumefaciens* y no infectivo de las mutantes NdvB de *R.meliloti* se debe a la ausencia del glucano β (1-2), la mutación se encuentra en el gen de la proteína intermediaria de la biosíntesis del polisacárido.
- 10) En las cepas de *R.meliloti* GR4, 102F34 y 2011 la región *ndvB* está conservada.
- 11) La mutación de GRT21s se encuentra en un fragmento de DNA Eco RI de 6,4 kb. No pudo determinarse la naturaleza exacta de la mutación, pero de ser una delección ésta sería menor de 100 pares de bases.



METODOS BACTERIOLOGICOS

Bacterias y plásmidos utilizados:

Las cepas y plásmidos utilizados, sus fenotipos, sus genotipos y orígenes se indican en las TABLAS XV y XVI.

TABLA XV
CEPAS UTILIZADAS

CEPA	FENOTIPO/GENOTIPO	ORIGEN
<i>R. meliloti</i> GR4	<i>nod</i> ⁺ <i>fix</i> ⁺	J. Olivares (142)
<i>R. meliloti</i> Grt21s	<i>nod</i> ⁺ / <i>fix</i> ⁺	J. Olivares (142)
<i>R. meliloti</i> 102F34	<i>nod</i> ⁺ <i>fix</i> ⁺	G. Ditta (39)
<i>A. tumefaciens</i> A90		E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> A723		E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> A348		E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i>	<i>chvB::Tn5</i> Kn ^R	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> A1045	<i>chvB::Tn5</i> Kn ^R	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME103	<i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME32	"downstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME3	"downstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME35	"downstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME101	"downstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME112	"downstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME111	"downstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME4	"downstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME41	"upstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME43	"upstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>A. tumefaciens</i> ME72	"upstream" <i>chvB::Tn3HoHo1</i> Cb ^R *	E. Nester (34)
<i>R. meliloti</i> SC1	<i>R. meliloti</i> Grt21s+pRAR205 <i>nod</i> ⁺ <i>fix</i> ⁺ Cb ^R	Esta tesis
<i>R. meliloti</i> SC15	<i>R. meliloti</i> Grt21s+pTY12 <i>nod</i> ⁺ <i>fix</i> ⁺ Tc ^R	Esta tesis
<i>R. meliloti</i> RAG1	<i>R. meliloti</i> Grt21s+pCD523 <i>nod</i> ⁺ <i>fix</i> ⁺ Tc ^R	Esta tesis
<i>R. meliloti</i> TU1	<i>R. meliloti</i> Grt21s+p186 <i>nod</i> ⁺ <i>fix</i> ⁺ Tc ^R	Esta tesis
<i>R. meliloti</i> SC6	<i>R. meliloti</i> GR4+pRAR205 <i>nod</i> ⁺ <i>fix</i> ⁺ Tc ^R	Esta tesis
<i>A. tumefaciens</i> SC5	<i>A. tumefaciens</i> A1011+pRAR205 <i>vir</i> ⁺ Kn ^R Cb ^R	Esta tesis

* Las inserciones del *Tn3HoHo1* se muestra en la Fig. 13.

Cb: Carbenicilina, Tc: Tetraciclina, Kn: Kanamicina.

TABLA XV
PLASMIDOS UTILIZADOS

PLASMIDOS	GENOTIPO	FUENTE
pRAR 205	pTJS 140 Cb ^R	E. Nester (34).
pCD 523	pLAFRI Tc ^R <i>chvB</i>	E. Nester (34).
pTY 12	pRK290 Tc ^R <i>ndvB</i>	G. Ditta (39).
p186	pSUP102, Tc ^R <i>ndvB</i>	A. Pühler (98).

Cb: Carbenicilina, Tc: Tetraciclina.

Condiciones de cultivo:

Rhizobium meliloti se cultivó en medio AMA⁽⁸⁵⁾ que contenía K₂HPO₄ 0,5%, MgSO₄·7H₂O 0,02%, NaCl 0,02%, manitol 1% y extracto de levadura 0.1% a pH=7. Se utilizó como inóculo un cultivo en fase logarítmica tardía en una relación 1/100 del volumen de cultivo. Para la preparación de membranas internas, los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 2000 ml con 1000 ml de medio a 28°C, con agitación rotatoria a 200 rpm. Las bacterias se cosecharon cuando el cultivo alcanzaba 0,8 unidades de absorbancia a 660 nm (OD₆₆₀) (26-30 hs.). Para la purificación de polisacáridos se utilizaron cultivos de 100 ml en erlenmeyers de 250 ml, utilizando el mismo tipo de inóculo que para la preparación de membranas. Las bacterias se cosecharon luego de 24 hs. de cultivo. En algunas ocasiones se aisló glucano de alícuotas de cultivos preparados para la purificación de membranas. Para determinar la producción de exopolisacárido se cultivo en medio LB sólido (agar 1,8%) suplementado con 0.02% de in análogo del Calcofluor, Cellufluor (Polisciences).

Agrobacterium tumefaciens se cultivó en medio Ty que contenía: Triptona 0,5%, extracto de levadura 0,3% a pH=7. El inóculo consistió en un cultivo en fase estacionaria (48 hs) en una relación 1/100 del volumen de cultivo. Se cultivó y cosechó en iguales condiciones que *Rhizobium meliloti*, sólo que el tiempo requerido para alcanzar una OD₆₆₀ de 0,8 fue de 12-16 hs. Para la marcación con ³⁵S-metionina, se cultivó en 50 ml de medio M9⁽¹³⁵⁾ (Na₂HPO₄·2H₂O 0,75%, KH₂PO₄ 0,3%, (NH₄)Cl 0,1%, NaCl 0,05%, MgSO₄·7H₂O 0.02%) suplementado con glucosa 0,2%. Cuando se alcanzó una OD₆₆₀ de 0,3 (aproximadamente 5 hs), se le adicionaron 8,7 µCi de ³⁵S-metionina (Act. Esp. 1031 Ci/µmol). El tratamiento posterior se describe en Métodos Bioquímicos.

Escherichia coli se cultivó en medio LB⁽⁷³⁾ que contenía triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5% y glucosa 0,5% a pH=7. Se utilizó el mismo tipo de inóculo que *Agrobacterium tumefaciens*, pero se cultivó a 37°C y agitación rotatoria (200 rpm).

Uso de antibióticos:

Cuando se requirió, se utilizaron los antibióticos en las concentraciones que se detallan en la TABLA XVII.

TABLA XVII.
ANTIBIOTICOS USADOS

Antibiótico	Concentración (µg/ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>R. meliloti</i>
Carbencilina ^{a)}	50-100	100-500	500
Tetraciclina ^{b)}	10	10	10
Kanamicina ^{b)}	50	100	no utilizado.

^{a)} Se utiliza en lugar de ampicilina por ser más efectivo en *R. meliloti*. Fue cedida gentilmente por Laboratorios Essex.

^{b)} Fueron cedidos gentilmente por Laboratorios Roemmers.

Conservación de las cepas:

Las bacterias se mantuvieron en dos condiciones: A) en el corto plazo (2 semanas) en cajas de Petri que contenían el medio específico, adicionado con agar 1.6%, cultivadas a la temperatura

adecuada hasta observar crecimiento y luego conservadas a 4 °C, y B) en el largo plazo cultivos frescos en medio líquido o sólido se congelaron a -70 °C en glicerol 20%.

Obtención de cepas merodiploides:

Los plásmidos pRAR205, pCD523 y pTY12 se introdujeron en las cepas deseadas por conjugación utilizando el método triparental según Helinsky y col⁽³¹⁾. Se utilizaron los plásmidos pRK2013 o pRK2073 como "helpers". En el caso del plásmido p186 se utilizó el método descrito por Phüler y col⁽¹²²⁾. La conjugación se realizó mezclando las cepas dadora, receptora y "helper" (cuando correspondía) sobre medio AMA sólido, se cultivó a 28 °C durante una noche, y al día siguiente se tomó con el ansa la zona de mezcla y se lo sembró en medio mínimo AB⁽⁵⁰⁾ que contenía K₂HPO₄ 0,3%, NaH₂PO₄ 0,1%, NH₄Cl 0,1%, MgCl₂·7H₂O 0,03%, KCl 0,015%, CaCl₂ 0,001%, FeSO₄·7H₂O 0,00025%, glucosa o sacarosa 0,5% y agar 1,6%, a fin de eliminar las cepas de *Escherichia coli*. Las cepas transconjugantes se purificaron por tres a cinco pasajes en medio AB.

Ensayo de movilidad:

La movilidad se determinó sembrando por punción cajas de Petri conteniendo medio AMA semisólido (0,35% de agar). Luego de incubación a 28 °C durante 24-48 hs se observó el crecimiento alrededor del punto de siembra.

METODOS BIOQUIMICOS.

Extracción de polisacáridos bacterianos:

Se cosecharon 100 ml de cultivo centrifugando 20 min a 5.000 g. Del sobrenadante se aisló exopolisacárido y β (1-2) glucano, mientras que de las células se aisló β (1-2) glucano.

a) Purificación de polisacáridos del sobrenadante de cultivo: El sobrenadante del medio de cultivo se concentró cinco veces (volumen final 20 ml) en un evaporador rotatorio a una temperatura no mayor de 50°C. El exopolisacárido se precipitó con tres volúmenes de etanol (60 ml), la fibra se enrollaron en una varilla de vidrio. Las fibras cortas se recogieron por centrifugación a 13.000 g durante 30 minutos. El exopolisacárido obtenido de esta manera se caracterizó como se describe más adelante. El sobrenadante se llevó a sequedad mediante evaporación rotatoria, se redisolvió en 8 ml de agua destilada y se agregaron 10 volúmenes de etanol, manteniéndose esta mezcla una noche a 4°C. El precipitado se recogió por centrifugación a 17000 g durante 20 minutos, se disolvió en 10 ml de agua y se ultrafiltró tres veces a través de una membrana Amincon YM2 (límite de exclusión 500 daltons) a fin de eliminar sustancias de bajo peso molecular. El concentrado se llevó a un volumen final de 2 ml.

b) Extracción de β (1-2) glucano celular: Se siguió el método de Miller et al⁽⁹⁵⁾. El pellet de células se resuspendió en TCA 1% (5 ml por 100 ml de cultivo) y se mantuvo a 0°C durante 15-30 minutos. Se centrifugó a 10000 g durante 15-30 min, el sobrenadante se neutralizó con NH_3 y se concentró bajo corriente de aire, por evaporación rotatoria o por liofilización. El concentrado se llevó a 1 ml con acetato de piridina 0,1 M pH=5,5.

Purificación y caracterización del β (1-2) glucano:

Los extractos provenientes de la precipitación con 10 volúmenes de etanol o de la extracción con TCA 1% se cromatografiaron en columnas (78 x 1.8 cm) de Bio-Gel P4 200-400 mesh (Bio Rad, Richmond USA), usando como buffer de elución acetato de piridina 0,1 M pH=5,5 a un flujo de 0,23 ml/min. Se recogieron fracciones de 1.5 ml y los azúcares se determinaron ya sea por el método de fenol/ SO_4H_2 ⁽¹¹⁾ o el método de la antrona⁽³⁰⁾. Los polisacáridos que eluyeron con K_{AV} comprendidos entre 0,12 y 0,25 se juntaron y concentraron por liofilización. Este material se caracterizó de acuerdo a los siguientes criterios: a) Cromatografía de intercambio aniónico: en columnas de DOWEX AG2x10, equilibradas con acetato de piridina 10 mM pH=5,5; eluidas con acetato de piridina 10 mM pH=5,5 para recuperar compuestos neutros y con ácido acético 1 M para recuperar sustancias cargadas, o en columnas de Sephadex A-25, equilibradas con agua de donde las sustancias cargadas se eluyeron con un gradiente discontinuo de 0,05 a 1 M de NaCl; b) Hidrólisis ácida suave y cromatografía en papel, una alícuota equivalente a 0,5 μg de glucosa se hidrolizó con HCl 0,5 N a 100°C durante 10 a 30 min. El hidrolizado se llevó a sequedad cuatro veces mediante evaporación rotatoria a fin de eliminar el HCl y la muestra resuspendida en 100 μl de agua se sometió a cromatografía descendente en papel Wathman 1 utilizando como solvente isopropanol:ácido acético:agua [27:4:9] (solvente A); c) Hidrólisis ácida total y cromatografía en papel, una alícuota (equivalente 5-25 μg de glucosa) se hidrolizó con HCl 1N durante 4 hs. Los productos se sometieron a cromatografía en papel descendente en butanol:piridina:agua [6:4:3] (solvente B).

En las cromatografías los azúcares se localizaron por el método de la plata alcalina⁽¹⁴³⁾. En el caso de muestras radioactivas, se cortaron tiras de 1 cm y se midió la radioactividad en un contador de

centelleo líquido, usando como líquido de centelleo una mezcla de tolueno-OMNIFLUOR^R (NEN Research Products, Du Pont).

Caracterización del exopolisacárido.

El precipitado resultante de la adición de 3 volúmenes de etanol al sobrenadante de cultivo se reprecipitó 3 veces, liofilizó y 1 mg peso seco se disolvió en agua, y se cromatógrafió a través de una columna de Bio Gel A5m (44x1 cm) equilibrada en acetato de piridina 0,1 M pH=5,5; a un flujo de 0,12 ml/min. Se recogieron fracciones de 2 ml, los azúcares se detectaron por el método del fenol sulfúrico. Los grupos acetilo y piruvilo se determinaron de acuerdo a métodos descritos previamente⁽¹⁴³⁾. Los azúcares constituyentes se determinaron mediante hidrólisis ácida total y posterior cromatografía en papel con solvente B.

Preparación de membranas internas.

Para la preparación de membranas internas se siguió el protocolo descrito por Osborn y col^(102,119). Se cosecharon por centrifugación a 3000-6000 g durante 30 min cultivos en fase logarítmica tardía ($DO_{660}=0,7-0,9$) (1 a 3 lt.). Las células se lavaron con Tris HCl 30 mM pH=8,2 (10-20 ml), y se incubaron con lisozima (0,1 mg/ml) a 0°C durante 45-60 min en sacarosa 20%, Tris 30 mM pH=8,2 EDTA 10 mM. Los esferoplastos obtenidos se recuperaron por centrifugación a 12.000 g durante 30 min; éstos se resuspendieron con el buffer mencionado conteniendo 10 mM Cl_2Mg , y se agregaron 500 μg de Deoxirribonucleasa tipo I (Sigma # D-4527). Los esferoplastos se rompieron mediante 3 pasajes a través de una French Press. Luego del tratamiento se centrifugaron a 3.000 g durante 15 min, para descartar las células no rotas. El sobrenadante se centrifugó a 100.000 g durante 3 hs, con el objeto de separar la fracción citosólica (sobrenadante) de la fracción particulada (precipitado) que contiene las membranas internas y externas. La fracción particulada se resuspendió en 10 ml de sacarosa 20% (p/p) en HCl Tris 30 mM pH=8,2, y se sometió a centrifugación en un gradiente discontinuo de 55%, 44%, y 20% (p/p) de sacarosa en HCl Tris 30mM pH=8,2. La centrifugación se llevó a cabo en rotores SW 25.2 o SW40 a 70.000 g y 4°C durante 14-18 hs. Las membranas internas se recuperaron en la interfase 20-44%, mientras que las externas de la interfase 44-55%. A las membranas recuperadas del gradiente se les agregó 2 volúmenes de buffer Tris HCl 30 mM pH=8,2 y se centrifugaron a 100.000 g durante 3 hs. El precipitado se resuspendió en la cantidad de buffer Tris HCl 30 mM pH=8,2 necesaria para alcanzar una concentración de proteínas entre 20 y 40 $\mu g/\mu l$. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry⁽⁸⁸⁾.

Síntesis in vitro de glucano β (1-2)

Se incubaron a 10°C membranas internas purificadas (100-200 μg de proteína) en presencia de Cl_2Mg 10 mM, Tris HCl-50 mM pH=8,2 y UDP[¹⁴C]Glc (50-100 Kcpm, Act. Específica 250-300 mCi/mmol) o UDP[³H]Glc (500 Kcpm, A. Esp. 3 mCi/ μ mol), en un volumen final de 50 μl .

Para la preparación de glucano β (1-2) la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 2 min. Se agregaron 0,3 ml de agua y se centrifugó a 1.500 g durante 10 min. El sobrenadante se cromatógrafió en una columna de Sephadex A-25 (4x0,5 cm.). La columna se lavó con 1,5 ml de agua. El líquido de lavado (fracción neutra) obtenido contiene el glucano β (1-2) radioactivo, mientras que el nucleótido azúcar sin reaccionar queda retenido en la columna. Bajo estas condiciones de incubación, no se sintetizan polisacáridos aniónicos.

La proteína intermediaria radioactiva se cuantificó deteniendo la reacción por adición de 0,5 ml de TCA 10%, el precipitado se recogió por filtración en un papel de fibra de vidrio (MFS # GC5024MM, Micro Filtration Systems, California). Para las electroforesis en geles de poliacrilamida el precipitado de TCA 10% se recuperó por centrifugación a 3.000 g durante 10 min, los pellets se trataron como se describe más adelante.

El [^{14}C] glucano β (1-2) se concentró por evaporación rotatoria o liofilización.

Digestiones parciales con tripsina.

Las membranas internas se incubaron con tripsina a fin de lograr digestiones parciales bajo dos condiciones: Condición 1, se incubaron las membranas internas purificadas (0,2 mg proteína) con tripsina (0,02 mg), en presencia de Tris-HCl 50mM pH=8,2 durante 5 min a 10°C. La reacción se detuvo por la adición de inhibidor de tripsina de poroto de soja (SBTI, 0,04 mg). Las membranas así tratadas se incubaron con UDP[^{14}C]Glc en condiciones de síntesis de glucano β (1-2). Condición 2, la digestión con tripsina se realizó en las mismas condiciones que en la Condición 1 durante 10 min pero luego de haber incubado previamente las membranas internas con UDP[^{14}C]Glc.

Cromatografía Líquida de Alta Presión.

Los compuestos neutros recuperados en el líquido de lavado de las columnas Sephadex A-25 se centrifugaron en centrífuga Eppendorff durante 10 min, y se sometieron a cromatografía líquida de alta presión, en columnas de sílica modificadas con grupos NH_2 (Lichrosorb NH_2 Merck, o Carbohydrate Analysis, Waters), utilizando como solvente de corrida acetonitrilo:agua, 55:45 o 70:30, dependiendo del estado de la columna y la temperatura ambiente a fin de lograr una separación óptima. El flujo fue de 1 ml/min y las fracciones recogidas de 0,5-1 ml. La radioactividad se midió en alícuotas de 0,5 ml en un contador de centelleo líquido utilizando como centelleador 4 ml de solución de Bray. Alternativamente, la radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido de flujo continuo (Flo-One β , Radiomatic Inst. Chemical Co In., Florida) usando solución de Bray como líquido centelleador.

Dosaje de actividad de β -galactosidasa:

Para determinar la actividad de β -galactosidasa en células enteras se procedió como se describió previamente⁽⁹³⁾. 1 ml de cultivo en fase estacionaria de *A. tumefaciens* se cosechó centrifugando 2 min en Eppendorf. El pellet se resuspendió por agitación en buffer Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.1 g/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,5 g/l, KCl 0.75 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,40 g/l, β -mercaptoetanol 2,7 ml/l, pH=7) y se adicionaron 20 μl de SDS 0,005% (p/v) y 20 μl de CHCl_3 , se incubó a 28°C durante 5 min, y se agregaron 100 μl de *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido. Se incubó a la misma temperatura durante 10 min. La reacción se detuvo por agregado de 1 ml de Na_2CO_3 0,1M.

Para los ensayos de actividad en las membranas internas, se incubaron 150 μg de proteínas, en presencia de deoxicolato de Na 0,1% (p/v), Tris HCl 100 mM pH=8, y *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido a la temperatura y tiempo especificados.

La actividad β -galactosidasa se determinó como se describió previamente.

Síntesis de novo de proteínas.

Las cepas A723 y A1045 cultivadas con ^{35}S -metionina, se cosecharon por centrifugación, se lavaron 2 veces con medio M9, y se resuspendieron en 1 ml de una solución que contenía Tris HCl 50 mM pH 8,2, 20 mM EDTA y 1 mg/ml de lisozima, se incubaron en hielo durante 30 min, y se sonicaron

6 veces a una potencia de 6 en un sonicador Sonifier Cell Disruptor (W140, Heath Systems Ultrasonic Inc. Plainview N.Y.). Las células rotas se centrifugaron a $20.000 \times g$ durante 60 min a 4°C . Se tomaron alícuotas del sobrenadante y el pellet, tal que contuvieran 50.000 cpm insolubles en TCA 10%, y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizaron electroforesis en gradientes de poliacrilamida de acuerdo a lo descrito previamente⁽⁴⁹⁾. Los precipitados de TCA 10% se disolvieron en 30-50 μl de una mezcla que contenía: Tris HCl 50 mM pH=6,8, β mercaptoetanol 2%, Urea 8M, SDS 2% y azul de bromofenol. Se neutralizaron los restos del TCA, agregando OHNa hasta viraje al azul. La muestra se calentó a 100°C durante 2-3 min, y se sometió a electroforesis.

El sistema electroforético consistió en un gradiente de acrilamida de 5 a 15%, Tris HCl 0,2 M pH=8,8, SDS 0,1%. Los geles tuvieron una dimensión de 13 cm de ancho, 20 cm de largo y 1,5 mm de espesor. El buffer de corrida utilizado contenía Tris glicina 25 mM pH=8,8 y SDS 0,1%. La electroforesis se desarrolló a potencia constante de 4 watts durante seis horas, o 0,6 watts durante 13 hs.

Las proteínas se tiñieron sumergiendo el gel inmediatamente después de la electroforesis en una solución de Coomassie Blue R-250 1,5% (p/v) en metanol:ácido acético:agua [45,5:45,5:9] durante tres horas. El exceso de colorante se removió por lavados sucesivos con solución fresca de Metanol 20% (v/v) y ácido acético 7% (v/v) en agua.

La radioactividad se detectó por fluorografía⁽⁸⁾, utilizando 2,5 difenil oxazol (PPO), de acuerdo al siguiente protocolo: se cambió el solvente del gel con dos lavados de 30 min en un exceso de dimetil sulfóxido (DMSO), luego se sumergió durante tres horas en una solución que contenía 22,2% de PPO u Omnifluor en DMSO, finalmente se lavó con un exceso de agua durante 1 hora a temperatura ambiente, o durante la noche a 4°C . Todos los lavados se realizaron con agitación. El gel saturado con PPO se secó al vacío con calentamiento (80°C), durante 3 hs sobre un papel tipo Wathman 1. Se expusieron sobre película KODAK X-Omat durante 7 a 30 días.

METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Preparación de DNA total.

Se aisló DNA total de *R.meliloti* GR4 y GRT21s siguiendo la técnica de Hull⁽⁶⁷⁾ con ligeras modificaciones. Se cosecharon células cultivadas en medio AMA durante 24 hs por centrifugación a 8.000 g. Se lavaron con Buffer TE 1x (Tris HCl 10 mM pH=8, EDTA 1 mM). Al precipitado resuspendido en 2 ml de sacarosa 25% (p/p) en TE 1x se le agregaron 2 mg de lisozima, y se mantuvo a 0°C durante de 5 min. Luego se agregaron 0,2 mg de proteinasa K y 4 ml de EDTA 0,5 M. Las células se lisaron por el agregado de 0,25 ml de Sarkosyl 10%. Posteriormente se las incubó a 60°C durante 16 hs con el objeto de digerir todas las proteínas celulares. Luego de esta incubación, la mezcla, que era de color amarillento translúcido y altamente viscosa, se depositó sobre 10 ml de una solución de CsCl (69,6 gr de CsCl en 55,2 ml de TE 1x) que contenía 50 µg/ml de floruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), con el objeto de inhibir la proteinasa K, y se centrifugó en un rotor SW40 a 15°C durante 40 hs a 36.000 rpm. Del gradiente de densidad formado se aspiró, con una pipeta Pasteur con el pico cortado, la banda superior, de aspecto opalescente y viscosa, correspondiente al DNA total. Este se dializó contra TE 1x a 4°C durante 48 hs con 4 cambios del buffer de lavado. La concentración de DNA se determinó midiendo la DO_{260} . La pureza se determinó mediante la relación DO_{260}/DO_{280} , que resultó ser 2.0 (relaciones óptimas varían entre 1,9 y 2,0 y menores a 1,8 califican al DNA como no apto para biología molecular)

Preparación de DNA plásmidico.

Los plásmidos se purificaron siguiendo el método de Birnboim y Doly⁽⁶⁾. Se partió de cultivos de 1000 ml, que se dividieron en cuatro alícuotas iguales. Cada una de estas alícuotas se trató como sigue. Las células, cosechadas por centrifugación a 8.000 rpm (rotor SS34), se resuspendieron en una solución que contenía 50mM glucosa, 25 mM Tris HCl pH=8 y 10 mM EDTA. Se añadió una punta de espátula de lisozima, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se añadieron 10 ml de la solución de lisis (0,2 M NaOH, 1% SDS), se incubó en hielo, con agitación ocasional y suave. Luego de 15 min, se añadieron 15 ml de una solución de acetato de potasio 3M. Se mantuvo 30 min en hielo. El DNA cromosomal, los restos celulares, las proteínas, y el SDS forman un complejo insoluble que se separó por centrifugación durante 20 min a 15 Krpm (rotor SS34). Al sobrenadante claro así obtenido, se le agregaron 0,7 volúmenes de isopropanol, y se mantuvo 15 min a temperatura ambiente. El precipitado conteniendo el DNA plasmídico se separó por centrifugación a 10 Krpm (rotor SS34) durante 15 min, y se lo lavó con etanol 70%. Para secar el precipitado se lo mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min (tiempos mayores dificultan la disolución posterior). Se agregaron 3,6 ml de TE 1x hasta disolución total del precipitado, luego 4,2 g de CsCl, finalmente cuando se hubo disuelto la sal se agregaron 0,1 ml de bromuro de etidio 10 mg/ml. En caso de aparecer turbidez, se centrifugó a 10 Krpm (rotor SS34) durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrifuga y se centrifugó a 40 Krpm (rotor R65 o 50Ti) durante 12-16 hs. En el gradiente formado aparecen un precipitado y tres bandas fluorescentes a la luz ultravioleta. El precipitado corresponde a RNA y proteínas, la banda de mayor densidad (la más cercana al fondo del tubo) corresponde a RNA, la banda de densidad media al DNA plasmídico circular cerrado, y la de menor densidad (que puede no aparecer) corresponde a DNA cromosomal o plasmídico circular con corte en una cadena o lineal. La banda de densidad media se recoge por aspiración con una jeringa. El bromuro de etidio se extrae con isopropanol saturado con CsCl, y se dializa 24 hs contra buffer TE 1x. El DNA plasmídico presente en

el dializado se concentró por precipitación con etanol, se resuspendió en buffer TE 1x (0,1-0,3 ml), y se determinó su concentración como se describió en la preparación de DNA cromosomal.

Métodos de purificación de ácidos nucleicos

Los métodos mencionados a continuación tienen por objeto desproteinizar las soluciones de ácidos nucleicos, eliminar agarosa de bajo punto de fusión cuando correspondiere, o concentrar el ácido nucleico.

Extracción fenólica: Se utiliza fenol recién destilado, previamente se lo equilibra con Tris HCl 1 M pH=8 (3-4 veces), hasta alcanzar un pH=7,6, y luego con una solución Tris HCl 0,1 M pH=8; 2 mM EDTA y 10 mM β -mercaptoetanol. Se le agrega β -hidroxiquinoleína hasta 0,1% y se lo conserva a 4°C.

La extracción se realiza con un volumen de fenol por cada volumen de solución, se agita, se centrifuga, y se recoge la fase acuosa (superior), sin tomar la interfase.

Extracción con fenol:cloroformo: Se realiza de la misma manera utilizando una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico [25:24:1].

Extracción con cloroformo: Se utiliza cloroformo :alcohol isoamílico [24:1], y se procede como en los casos anteriores.

Las extracciones se realizan en el orden descripto. Eventualmente se realizó una extracción final con éter etílico para eliminar otros solventes orgánicos. El éter etílico se elimina por evaporación a 42°C

Precipitación etanólica: Se realizó llevando a 0,3 M de acetato de sodio, o 2,5 M de acetato de amonio, se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se mantuvo 15 min a -70°C y se centrifugó de 15 a 30 min a 4°C en centrífuga Eppendorf.

Digestiones con endonucleasas de restricción:

Para la digestión del DNA plasmídico con enzimas de restricción se utilizaron las condiciones y buffers recomendadas por los proveedores.

En el caso del DNA total se incubaron 40 μ g de DNA con 60 unidades de cada enzima de restricción, con el buffer y temperatura recomendadas durante una noche.

En ambos casos las reacciones se detuvieron bien por congelamiento, o bien por adición de una mezcla detenedora que permitía la siembra en geles de agarosa, y que contenía: Azul de bromofenol 2.5% (p/v); 200mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH:8; Glicerol 50% (v/v).

Electroforesis en geles de agarosa.

Se aplicó la técnica descrita por Maniatis⁽⁸⁹⁾. Básicamente consistieron en electroforesis horizontales, utilizando como buffer de corrida TBE 0,5x (TBE 5x: 0,45 M H_3BO_3 Tris; 10 mM EDTA). La agarosa (BRL, # 5510UB) en concentraciones de 0,5 a 1% dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, adicionada con 1 μ g/ml de bromuro de etidio. Se desarrollaron a 1-5 V/cm (habitualmente 3 V/cm), durante el tiempo necesario para la separación adecuada. La posición de las bandas se visualizó con un transiluminador UV de marca FOTODYNE . Como marcadores de peso molecular se utilizaron digestos de DNA de fago lambda con la enzima Hind III.

Aislamiento de los fragmentos de DNA por electroelución.

Los fragmentos de DNA usados como sonda se electroeluyeron de los geles de agarosa siguiendo la técnica descrita por Maniatis⁽⁸⁹⁾, con algunas modificaciones. El plásmido se digirió, se separaron los fragmentos por electroforesis en agarosa, y se cortó el trozo del gel que contenía el fragmento de interés. Este fragmento se colocó dentro de una bolsa de diálisis con buffer TBE 0,25x, y la bolsa cerrada se colocó transversalmente en una cuba de electroforesis vertical que contenía el mismo buffer adicionado con 1 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Se aplicaron 15 V/cm. durante 30 min, al cabo de los cuales se invirtió la polaridad durante 0,5-1 min a fin de despegar el DNA que hubiera podido quedar pegado a la bolsa de diálisis. Se verificó la totalidad de la electroelución por una observación rápida a la luz ultravioleta. La solución de la bolsa de diálisis conteniendo el fragmento de interés se recuperó, se trató con fenol:cloroformo, y cloroformo, se concentró, y se estimó su concentración por electroforesis en un minigel de agarosa (0,3x4x10 cm).

Marcado por "random priming".

Este método consiste en la hibridización del fragmento de DNA a marcar con hexanucleótidos y la posterior utilización de estos últimos como "primer" por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Los oligonucleótidos provienen de la digestión parcial de DNA de timo, y están representadas todas las secuencias de bases posibles. Este método rinde sondas de alta actividad específica y permite marcar cantidades pequeñas de DNA.

Se utilizó un kit comercial (Boheringer Mannheim), y se procedió de acuerdo a las condiciones recomendadas por el proveedor. Se mezclaron 40-200 ng de DNA desnaturalizado, con el buffer conteniendo los oligonucleótidos, tres nucleótidos fríos, 50 μCi del restante oligonucleótido radioactivo (dATP α [³²P] odCTP α [³²P]), 10 unidades del fragmento Klenow, y se incubó durante 16 hs a 37°C. El nucleótido que no reaccionó (30% aproximadamente), se eliminó por filtración en una columna (0,5x6 cm) de Sephadex G-50 equilibrada con buffer TE 1x. El fragmento de DNA radioactivo se recuperó en el excluido. La actividad específica lograda de esta manera fue aproximadamente de 1×10^8 cpm/ μg de DNA.

Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa ("Southern blot") e hibridización.

El gel de agarosa donde se desarrolló la electroforesis se trató durante 30 min con 330 ml de una solución de NaOH 0,5 M NaCl 1,5 M y agitación, con el objeto de desnaturalizar el DNA. Posteriormente se neutralizó el gel incubando otros 30 min con el mismo volumen de Tris HCl 1 M pH=8 y NaCl 1,5 M, con agitación constante. El DNA se transfirió a filtros de nitrocelulosa siguiendo la técnica de Southern⁽¹²⁵⁾, utilizando como solución de transferencia 20x SSC (3M NaCl, 0,3M Citrato de sodio). Los filtros se calentaron a 80°C. La prehibridización se llevó a cabo en bolsas de polietileno durante 30 min a 65°C en una solución que contiene: 3x SSC; 5x Denhardt (50x Denhardt: Ficoll 2% (p/v); polivinilpirrolidona 2% (p/v); albúmina sérica bovina 2% (p/v)); DNA de esperma de salmón 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y SDS 0,1% (p/v). Para la hibridización se agregó la sonda (0,5-1 $\times 10^3$ cpm/ml, Act. Esp. $> 1 \times 10^7$ cpm/ μg DNA), y se mantuvo a 65°C durante 20-24 hs con agitación. Los filtros hibridizados se lavaron 3 veces durante 45 min con 1x SSC; 0,1% SDS (p/v) a la misma temperatura. Los filtros secos o húmedos se expusieron a -70°C con una película X-Omat, utilizando pantallas intensificadoras durante 1-20 días.

Para rehibridizar los filtros, se lavaron sumergiendo el filtro en 0,15 N NaOH durante 10 min, se neutralizó con tres lavados de 3x SSC de 10 min cada uno.

ENSAYOS DE INTERACCION BACTERIA PLANTA.

Preparación de las planta:

Se realizó de acuerdo a lo descrito previamente⁽⁵⁸⁾. 100-200 semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) se colocaron con 100 ml de H₂SO₄ concentrado durante 5 min, luego se diluyó a 1000 ml con agua destilada estéril en baño de hielo, se removió esta solución y se lavó cinco veces con 500 ml de agua destilada estéril cada vez. Las semillas estériles se germinaron durante 24-48 hs. en placas de Petri con medio AMA sólido a 30°C. Las semillas germinadas se transfirieron a tubos de vidrio (17,5 x 2 cm.) con 10 o 20 ml de medio Jensen⁽¹⁴⁸⁾ (CaPO₄ 1 g/l; K₂HPO₄ 0,2 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,2 g/l; NaCl 0,2 g/l; FeCl₃ 0,1 g/l y agar 0,8 g/l, suplementado con 1 ml de una solución de oligoelementos (Bo 0,05%; Mn 0,05%; Zn 0,005%; Mo 0,005%; Cu 0,002% a pH=7). Estos tubos se transfirieron a un cuarto climatizado (23-25°C), iluminado con tubos Grolux (fotoperíodo: 18 hs.). Las plantas se inocularon dentro de los 3 a 7 días de transferencia al tubo con *R. meliloti* de un cultivo de (DO₆₆₀=0,8).

Tinción de raíces no fijadas y observación microscópica.

En este caso las plantas se transfirieron a tubos pico de flauta con medio Jensen. La inoculación consistió en exponer las raíces al cultivo de la bacteria durante 15 min. A partir de este momento, diariamente, y hasta 10 días se retiraron plantas y se separaron las raíces ubicándolas sobre un portaobjeto. Las raíces se tñieron sobre el portaobjetos con azul de metileno 0,05%⁽¹⁴⁷⁾ en solución de Fahreus⁽⁴⁸⁾ (CaCl₂ 0,01%, MgSO₄·7H₂O 0,012%, KH₂PO₄ 0,01%, Na₂PO₄·2H₂O 0,015%, citrato de hierro 0,0005%, trazas de Mn, Cu, Zn, B, Mo). La observación se realizó al microscopio óptico en campo claro a 100 y 400 aumentos. Para las fotografías se utilizaron películas Kodak VR-G 400 asa.

Ensayo de nodulación.

Las plantas en tubos con 20 ml de medio Jensen se inocularon con 0.2 ml de un cultivo de *R. meliloti*, y se mantuvieron durante 4 semanas en el cuarto climatizado.

Ensayo de reducción de acetileno.

La capacidad para fijar nitrógeno de los nódulos se determinó por reducción del acetileno a etileno. Los tubos se sellaron, y se reemplazó 5 ml de aire por el mismo volumen de acetileno. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 a 4 hs. El etileno se separó por cromatografía gaseosa, utilizando una columna de Porapack N, y se detectó con un detector de llama.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Amemura A., Hitsamatsu M., Mitani H., Harada T. (1983). *Carbohydr. Res.* **114**:277.
- 2) Batley M.J., Redmond S.P., Djordjevic S.P., Rolfe B.G. (1987). *Biochem. Biophys. Acta* **901**:119.
- 3) Benincasa M., Cartoni G.P., Coccioli F., Rizzo R., Zevenhuizen L.P.T.M. (1987). *J. Chromatogr.* **393**:263.
- 4) Bhuvaneswari T.W., Pueppke S.G., Bauer W.D. (1977). *Plant Physiol.* **60**:486.
- 5) Binns A.N., Thomashow M.F. (1988). *Ann Rev. Microbiol.* **42**:575.
- 6) Birnboim H., Doly J. (1979). *Nucleic Acids Res.* **7**:1513.
- 7) Bohoolool B.B., Schmidt E.L. (1974) *Science* **185**:269..
- 8) Bonner W., Laskey R.A. (1974). *Eur. J. Biochem.* **46**:83.
- 9) Braun A.C. (1952). *Growth* **16**:65.
- 10) Braun A.C., Mandle R.J. (1948). *Growth* **12**:255.
- 11) Buboiss M., Gilles K., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1951). *Nature (London)* **168**:167.
- 12) Buffard D., Kaminsky P.A., Strosberg A.D. (1988). *Planta* **173**:367.
- 13) Cangelosi G.A., Hung L., Puvanesarajah V, Stacey G. Ozga D.A., Nester E.W. (1987). *J. Bacteriol.* **169**:2086.
- 14) Cangelosi G.A., Martinetti G., Leigh J.A., Lee C.C., Theines C. Nester E.W. (1989). *J. Bacteriol.* **171**:1609.
- 15) Close T.J., Rogowsky P.M., Kado C.I., Winans S., Yanofsky M. (1987). *J. Bacteriol.* **169**:5113.
- 16) Close T.J., Tait R.C., Kado C.I. (1985). *J. Bacteriol.* **164**:774.
- 17) Close T.J., Tait R.C., Rempel H.C., Hirooka T., Kim L. (1987). *J. Bacteriol.* **169**:2336.
- 18) Dazzo F.B, Truchet G.L, Hrabak E.M. (1984). *En Adv. Nitrogen Fixation Res.* Ed. por C. Veefer W.E. Newton. Nijof The Hague (Holanda).
- 19) Dazzo F.B., Napoli C.H., Hubbel D.H. (1976) *Appl. Envirom. Microbiol.* **32**:166.
- 20) Dazzo F.B., Yanke W.E., Brice W.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **539**:276.
- 21) Debelle F. Sharma S.B. (1986). *Nuclcic Acid Res.* **14**:7453.

- 22) Debelle F., Rosenberg C. Vasse J., Maillet F., Martinez E., Dènariè J., Truchet G. (1986) *J.Bacteriol.* **178**:1075.
- 23) Delauney A.J., Verma D.P.S. (1988). *Plant. Mol. Biol. Reporter* **4**:279.
- 24) Dell A., York W.S., Mc Neil M., Darvill A.G., Albersheim P. (1983). *Carbohyd. Res.* **117**:185.
- 25) Dellaporta S.L., Pesano R.L. (1981). *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. por K.L. Giles A.G. Ather. Academic Press. New york.
- 26) Denarie J., Boistard P., Casse Delpart F., Atherly A.G., Russel P. (1981). *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. por K.L. Giles A.G. Ather. Academic Press. New york.
- 27) Diaz C.L., Lugtenberg B.J.J. (1988). *Planta* **173**:367.
- 28) Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1989) *Nature* **338**:579.
- 29) Dickstein R., Bisseling T., Reinhold V.N., Ausubel F.M. (1988). *Genes & Develop.* **2**:677.
- 30) Dische, Z. 1962. *Methods Carbohyd. Chem.* **1**:478.
- 31) Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinsky D.R. (1980). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**:7347.
- 32) Djordjevic S.P., Ridge R.W., Chen H., Redmond J.W., Rolfe B.G. (1988). *J.Bacteriol.* **170**:1848.
- 33) Doherty D., Leigh J.A., Glazaebrook J., Walker G.C. (1988). *J.Bacteriol.* **170**:4249.
- 34) Douglas C.J., Staneloni R.J., Rubin R.A., Nester E.W. (1985). *J. Bacteriol.* **161**:850.
- 35) Downie J.A., Knight C.D., Johnston A.W.B., Rossen L. (1985) *Mol. Gen. Genet.*
- 36) Downie J.A., Surin B.P., Evans I.J., Rossen L., Firmin J.L., Shearman C.A., Johnston A.W.B. *(1987). *En Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*. Ed. por R. Palacios y D.P.S. Verma. APS Res., Minessota.
- 37) Downs F., Pigman W. (1976). *Methods Carbohydr. Chem.* **7**:241.
- 38) Dreyfus B., Garcia J.L., Gillis M. (1988). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:89.
- 39) Dylan I., Ielpi L. Kashyap L., Douglas C.J., Yanosfky M., Nester E.W., Helinsky D.R., Ditta G.S. (1986). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**:4403.
- 40) El-Fiki F., Giles K.L. (1981). *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. por K.L. Giles A.G. Ather. Academic Press. New york.
- 41) Elkan J. (1981). *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. por K.L. Giles A.G. Ather. Academic Press. New york.

- 42) Engler G., Depicker A., Maenhaut R., Villarroel R., van Montagu M. (1981). *J. Mol. Biol.* **152**:183.
- 43) Evans I.J., Downie J.A. (1986). *Gene* **43**:95.
- 44) Finan T.M., Kunkel G.F., DeVos G.F., Signer E.R. (1986). *J. Bacteriol.* **167**:66.
- 45) Finan T.M., Hirsch A.M., Leigh J.A., Johansen E., Kuldau G.A., Deegan S., Walker G.C., Signer E.R. (1985). *Cell* **40**:869.
- 46) Fisher R.F., Egelhoff T.T., Mulligan J.T., Long S.R. (1988). *Genes & Develop.* **2**:283.
- 47) Fuller F.F., Verma D.P.S. (1984). *Plant Mol. Biol.* **3**:21.
- 48) Fhraeus G. (1957). *J. Gen. Microbiol.* **16**:374.
- 49) Garcia-Patrone M. (1985). *Mol. Cell Biochem.* **68**:131.
- 50) Garfinkel D.J., Simpson R.B., Ream L.W., White F.F., Gordon M.P., Nester E.W. (1981). *Cell* **27**:143.
- 51) Gatehouse J. A. (1987). *Nucleic Acid Res.* **15**:7642.
- 52) Gheysen G., Dahese P., van Montagu M., Schell J. (1985). *Advances in Plant Gene Research*. Ed. por B. Hohn, E.S. Dennis. Springer Verlag, Viena.
- 53) Gorlitz R.H.G., Lamb P.W., Mathysse A.G. (1987). *Plant Physiol.* **83**:564.
- 54) Gotz R., Evans I.J., Downie J.A., Johnston A.W.B. (1985). *Mol Gen. Genet.* **201**:296.
- 55) Govers F., Gloudemans T., Moverman M., van Kammen A., Bisseling T. (1985). *EMBO J.* **4**:861.
- 56) Govers F., Moerman N., Downie J.A., Hooykaas P., Louwse J., van Kammen A., Bisseling T. (1986). *Nature* **323**:564.
- 57) Halverson L.J., Stacey G. (1986) *Microbiol. Rev.* **50**:193.
- 58) Handelsman J., Ugalde R.A., Brill W.J. (1984). *J. Bacteriol.* **157**:703.
- 59) Hellnigel H., Willfarth H. (1888). *Beilage Z. vers. Rubenzuckerind.*
- 60) Herrera-Estrella A., Chen Z.M., van Montagu M., Wag K. (1988). *EMBO J.* **7**:4055.
- 61) Himatsu M., Amemura A., Koizumi K., Utamura T., Okada Y. (1983). *Carbohydr. Res.* **121**:31.
- 62) Hirooka T., Rogowsky P.M., Kado C.I. (1987). *J. Bacteriol.* **169**:1529.

- 63) Hitsamatsu M., Amemura A., Matsuo T., Matsuda H., Harada T. (1982). *J. Gen Microbiol.* **128**:1873.
- 64) Hitsamatsu T., Yamada T., Higashiura T., Ikeda M. (1987). *Carbohydr. Res.* **163**:115.
- 65) Hooykaas P.J.S., Schilperoort R.A. (1984). *Adv. Genet.* **22**:210.
- 66) Horvath B, Kondorosi E., John M. Schmidty J., Torok I., Gyorgypal Z., Barabas I., Wienecke V., Schell J., Kondorosi A. (1986). *Cell* **46**:335.
- 67) Hull R.A, Gill R.E., Hsu P., Minshew B., Falkow S. (1981). *Inf. and Inmun.* **33**:933.
- 68) Iñon de Iannino, N., Ugalde R.A. (1989). *J. Bacteriol* **171**:2842.
- 69) Jayaswal, R.K., Veluthambi K., Gelvin S.B., Slightom J.M. (1987). *J. Bacteriol.* **169**:5035.
- 70) Jaynes J.M., Strobel G.A. (1981) *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. por K.L. Giles A.G. Ather. Academic Press. New york.
- 71) John M. Schmidt J. Wienecke V., Kondorosi E., Kondorosi A., Schell J. (1985). *EMBO J.* **4**:2425.
- 72) Jordan D.C. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 73) Kahn M., Kolter R., Thomas C., Figurski D., Meyer R., Regault E., Helinsky D.R. (1979). *Meth. in Enzymol.* **68**:268.
- 74) Kaminsky P.A., Buffard D., Strosberg A.D. (1987). *Pl. Mol. Biol.* **9**:497.
- 75) Kijne J.W., Smit G., Diaz C.L. Lugtenberg B.J.J. (1987). *J. Bacteriol.* **170**:2994.
- 76) Koizumi K., Okada Y., Horiyama S., Utamura T., Hisamatsu M., Amemura A. (1983). *J. Chromatogr.* **265**:89.
- 77) Kondorosi A., Kiss G.B., Dusha I. (1984). *En Current Developments in Biological Nitrogen Fixation*. Ed. por N.S. Suba Rao.
- 78) Kondorosi E., Kondorosi A. (1986). *Trends Biochem. Sci.* **11**:296.
- 79) Kossalak R., Appelbaum E., Stacey G., Hennecke H., Bassan B. resultados no publicados.
- 80) Lang-Unasch A., Ausubel F.M. (1985). *Plant Physiol.* **77**:833.
- 81) Leigh J.A., C.C. Lee. (1988). *J Bacteriol.* **170**:3327-3332.
- 82) Leigh J.A., Signer E.R., Walker G.C. (1985). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**:6231.

- 83) Leigh J. A., J.W. Reed, J. F. Hanks, A. M. Hirsch, and G. C. Walker. (1987). *Cell*, **51**:579.
- 84) Lepek V.C. (1989) Tesis Doctoral. FCEN-UBA.
- 85) Leps W.T., Brill W.J., Bingham E.T, (1980). *Crop Sci.* **20**:427.
- 86) Leroux B., Yanosky M.F., Winans S.C., Wars J.E., Ziegler S. (1987). *EMBO J.* **6**:849.
- 87) Long S.R., Cooper J. (1988). En *Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*. Ed. por R. Palacios y D.P.S. Verma. APS Res., Minnessota.
- 88) Lowry O.H., Rosebrough N.H., Farr A.L., Randall R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**:265.
- 89) Maniatis T., Ritsch E.F., Sambrook J. (1982). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory.
- 90) Mathysse A. (1987). *J. Bacteriol.* **169**:313.
- 91) Melchers L.S., Thompson D.U., Idler K.B., Schilepoort R.A., Hooykaas P.J.T. (1986). *Nucleic Acid Res.* **14**:9933.
- 92) Messens E., Lenaerts A., van Montagu M., Hedges R.W. (1985). *Mol. Gen. Genet.* **199**:344.
- 93) Miller H.J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 94) Miller K.J., Gore R.S., Benesi A.J. (1988). *J.Bacteriol.* **170**:4569.
- 95) Miller K.J., Kennedy E.P., Reinhold V.N. (1986). *Science* **231**:48.
- 96) Miller K.J., Reinhold V.N., Weissborn A.C., Kennedy E.P. (1987). *Biochem. Biophys. Acta* **901**:112.
- 97) Moore L.W., Cooksey D.A. (1981). *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. por K.L. Giles A.G. Ather. Academic Press. New york.
- 98) Müller P. Hynes M., Kapp D., Niehaus K, Phüller A. (1988). *Mol. Gen. Genet.* **211**:17.
- 99) Neff N.T., Binns A.N. (1985). *Plant Physiol.* **77**:35
- 100) Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M., Yanofsky M.F. (1984). *Plant Physiol.* **83**:525.
- 101) Nutman P.S. (1952). *Ann Bot.* **16**:8.
- 102) Osborn M.J., Munson R. (1984). *Meths. Enzymol.* **31A**:642.
- 103) Paav A.S., Leps W.T., Brill W.J. (1981). *Science* **213**:1513.

- 104) Peters K.N., Frost J.W., Long S.R. (1986). *Science* **223**:977.
- 105) Pierce M., Bauer W.B. (1983). *Plant Physiol.* **73**:286.
- 106) Postgate J. (1987). *Nitrogen fixation* (2° Ed.) E. Arnold Publishers.
- 107) Puvanesarajah V, Schell F.M., Stacey G., Douglas C.J., Nester E.W. (1985). *J. Bacteriol.* **164**:102.
- 108) Redmond J.W., Batley M., Djorjevic M., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G. (1986) *Nature* **323**:632.
- 109) Reed J.W., Glazebrook J., Long S., Reuber L., Walker G.C. (1988). En *Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*. Ed. por R. Palacios y D.P.S. Verma. APS Res., Minnessota.
- 110) Robertsen B., Aman P., Parvill A.G., McNeil M., Albersheim P. (1981). *Plant Physiol.* **67**:389.
- 111) Robertson J.G., Lyttleton P. (1982). *J. Cell Sci.* **58**:63.
- 112) Rogowsky P.M., Close T.J., Chimera J.A., Shaw T.J., Kado C.I. (1987). *J. Bacteriol.* **169**:5101.
- 113) Rolfe B.G., Gresshoff S. (1988) *Ann. Rev., Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **39**:297.
- 114) Rolfe B.G., Shine J. (1984). En *Genes Involved in Microbe plant Interactions*. *Plant Gene Research*. Ed. por D.P.S. Verma. 1:95.
- 115) Rossen L., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1984) *Nucleic Acid Res.* **12**:9497.
- 116) Rostas K., Kondorosi E., Horvath, Simoncsits A., Kondorosi A. (1986). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**:757.
- 117) Ruvkin G.B., Ausubel F.M. (1981). *Nature (London)* **289**:85.
- 118) Schmidt J., John M., Wienecke V., Krussmann H.D., Schell J. (1986). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**:9581.
- 119) Schnaitman C.A. (1981). En *Manual of methods for general bacteriology*. Ed. por P. Gerhardt. *Am. Soc. Microbiol.*
- 120) Schofield P.R., Watseon J.M. (1986). *Nucleic Acid Res.* **14**:2891.
- 121) Shearman C.A., Rossen L., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1986). *EMBO J.* **5**:647.
- 122) Simon R. Prierer U., Pühler A. (1983). *Biotechnology* **1**:784.
- 123) Sloneker J.H., Orentas D.G. (1962). *Nature (London)* **194**:478.
- 124) Smit G. (1988). *Tesis Doctoral*. Rijkuniversiteit te Leiden.

- 125) Southern E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**:503.
- 126) Spaink H.P., Wijttelman C.A., Pees E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.H.J. (1987). *Nature* **328**:337.
- 127) Stachel S.E., An G., Flores C., Nester E.W. (1986). *EMBO J.* **4**:891.
- 128) Stachel S.E., Gynheung A., Flores C., Nester E.W. (1985). *EMBO J.* **4**:891.
- 129) Stachel S.E., Nester E.W. (1986). *EMBO J.* **5**:1445.
- 130) Stachel S.E., Nester E.W., Zambrisky P. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:379.
- 131) Stachel S.E., Zambrisky P.C. (1986). *Cell* **46**:325.
- 132) Stachel S.E., Zambrisky P.C. (1986). *Cell* **47**:155.
- 133) Staneloni R.J., Tolmasky M.E., Leloir L.F. (1984). *J. Gen. Microbiol.* **130**:869.
- 134) Stanfield S.W., Ielpi L., O' Brochta D. Helinsky D.R., Ditta G.S. *J. Bacteriol.* **170**:3523.
- 135) Studier F.W. (1973). *J. Mol. Biol.* **79**:237.
- 136) Tempe J., Goldman A. (1982). *Molecular Biology of Plant Tumors*. Ed. por G. Kahl y J. Schell.
- 137) Thomashow M.F., Karlinsky J.E., Marks J.R., Huberlt R.E. (1987) *J. Bacteriol.* **169**:3209.
- 138) Thomashow M.F., Nutter R., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:7260.
- 139) Tolmasky M.E., Staneloni R.J., Leloir L.F. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**:6751.
- 140) Tolmasky M.E., Staneloni R.J., Ugalde R.A., Leloir L.F. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* **203**:358.
- 141) Toro, N and J. Olivares (1986). *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1148.
- 142) Trevelyn W.F., Procter C.P., Harrison J.F. (1950) *Nature (London)* **166**:444.
- 143) Truchet G., Michael M., Dènariè J. (1980). *Differentiation* **16**:163.
- 144) Truchet G., Rosemberg C. Vasse J., Julliot J.S., Camus S., Dènariè J. (1984). *J. Bacteriol.* **157**:134.
- 145) Uttaro A.D., Cangelosi G.A., Geremia R.A., Ugalde R.A. (1989). Manuscrito en preparación.
- 146) van Brussel A.A.N., Zaat S.A.J., Canter-Cremers H.C.J., Wijffelman C.A., Pees E. Lugtenberg B.J.J. (1986). *J. Bacteriol.* **165**:517.

- 147) Vasse J.M., Truchet G.L. (1984). *Planta* **161**:487.
- 148) Vincent J.M. (1970). *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Blacwell Scientific Publications, Oxford.
- 149) Vincent J.M. (1980). En *Nitrogen Fixation*. Ed. por W.E. Newton y W.H. Orme Johnson. University Park Press, Baltimore.
- 150) Ward H.M. (1987) *Phil. Trans. Roy. Soc. (London) Ser. B* **178**:539.
- 151) Ward J.E., Akiyoshi D.E., Regier O., Datta A., Gordon M.P. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**:5804.
- 152) Weiler E.W., Schroder J. (1987). *Trends in Biochem. Sci.* **12**:271.
- 153) Winans S.C., Allenza P., Stachel S.E., McBride K.E., Nester E.W.(1987). *Nucleic Acid Res.* **15**:825.
- 154) Winans S.C., Ebert P.R., Stachel S.E., Gordon M.P., Nester E.W. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8278.
- 155) Yanosfky M., Lowe B., Montoya A., Rubin R.A., Krul W. (1985).*Mol. Gen. Genet.* **201**:237.
- 156) Zaad S.A.J., Wijttelman C.A., Spaink H.P., van Brussel A.A.N., Okker R.J.H., LUgtenberg B.H.J. (1987). *J.Bacteriol.* **169**:198.
- 157) Zevenhuizen L.P.T.M. (1971). *J. Gen. Microbiol.* **68**:239.
- 158) Zevenhuizen L.P.T.M. (1973). *Carbohydr. Res.* **26**:409.
- 159) Zorreguieta A. (1988). Tesis Doctoral.
- 160) Zorreguieta A. Tolmasky M.E., Staneloni R.J. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **238**:368.
- 161) Zorreguieta A., Ugalde R.A. (1986) *J.Bacteriol.* **1167**:947.
- 162) Zorreguieta A., Ugalde R.A., Leloir L.F. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**:352.

