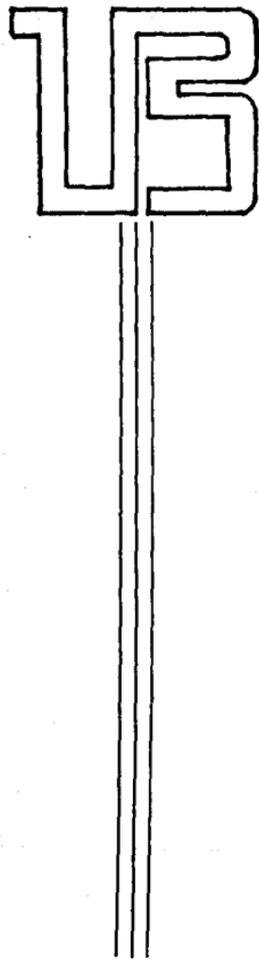


304406

2
2ej'



Universidad Simón Bolívar

Incorporada a la
Universidad Autónoma de México

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES
DE **Rhizobium phaseoli** CIAT-899 DEFICI-
ENTES EN LA PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P r e s e n t a:

VERONICA NUÑEZ NAVA

México D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1.	Introducción.....	1
1.1	Obtención y utilidad de las mutantes en el estudio del fenómeno de fijación de nitrógeno.....	3
1.2	Estudio de la simbiosis planta- <u>Rhizobium</u>	6
1.3	Los genes de nodulación.....	8
1.4	El papel de los polisacáridos y lipopolisacáridos de <u>Rhizobium</u> en el proceso de infección.....	10
2.	Justificación del proyecto.....	16
3.	Objetivo.....	18
4.	Estrategia.....	19
5.	Metodología.....	20
5.1	Bacterias y plásmidos.....	20
5.2	Medios y condiciones de crecimiento bacteriano....	20
5.3	Aislamiento de mutantes obtenidas por medio de la inserción del <u>Tn5mob</u>	20
5.4	Prueba de tinción con calcofluor.....	21
5.5	Formación de nódulos.....	21
5.6	Transferencia de material genético de <u>Rhizobium</u> a <u>A. tumefaciens</u>	22
6.	Resultados.....	27
7.	Discusión.....	33
8.	Conclusión.....	38
9.	Bibliografía.....	39

RESUMEN

En el proceso de infección de Rhizobium a las leguminosas, participan moléculas producidas por ambos organismos. Entre estas moléculas están los exopolisacáridos (EPS) bacterianos que se ha propuesto participan en los eventos iniciales de la infección, como la formación del cayado de pastor o la hebra de infección. Para investigar el papel de los EPS en la capacidad de R. phaseoli cepa CIAT-899 de infectar y nodular a huéspedes específicos, en este trabajo se aislaron y caracterizaron 7 mutantes seleccionadas por su fenotipo Muc- (MSE-V-01 a 07). Para demostrar que el fenotipo Muc- es debido a la deficiencia en la producción de EPS se realizó la prueba de tinción con calcofluor, el cual se une al polisacárido de pared de la bacteria (Finan, 1987). Se observó que todas las mutantes fueron deficientes en su unión con calcofluor. Una de las mutantes MSE-V-03 presentó un fenotipo ligeramente más mucóide que el resto de las mutantes. Por otra parte, la relativamente alta transferencia del Tn5 a A. tumefaciens sugirió que el sitio de inserción del transposón y por lo tanto la localización de los genes responsables de la producción de EPS es un plásmido bacteriano. En los ensayos de nodulación con las mutantes, se observó que en las plantas inoculadas con la cepa silvestre y con la mutante 03 los nódulos aparecieron más rápidamente (10 a 15 días) que en las plantas inoculadas con las demás mutantes. Además los nódulos silvestres fueron rojizos en la cepa silvestre y las mutantes 03 en contraste con las de otras cepas fueron pequeños y blanquecinos.

1. INTRODUCCION

Toda la vida terrestre depende de la energía solar que es utilizada para la reducción del bióxido de carbono (CO_2) a sustancias orgánicas. Esta producción primaria la llevan a cabo organismos fotosintéticos, que no sólo dependen del CO_2 , sino también de otros elementos. El elemento que se considera como el factor más limitado para la producción primaria es el nitrógeno. Aunque en la atmósfera se encuentran grandes cantidades de nitrógeno son relativamente pocos los organismos que poseen la capacidad de utilizar este elemento. Se ha observado que los organismos que fijan nitrógeno requieren de la actividad de la enzima nitrogenasa. Sin embargo, la reducción de nitrógeno no sólo depende de la formación de dicha enzima sino de otros factores como la regulación celular e intercelular, de procesos metabólicos y del medio ambiente tanto de factores abióticos como bióticos (Quispel, 1974). Hasta ahora se ha encontrado que sólo algunas bacterias y algas azules tienen la habilidad de satisfacer sus requerimientos de nitrógeno, convirtiendo el nitrógeno atmosférico en una forma utilizable para sintetizar.

Los organismos fijadores de nitrógeno pueden ser de vida libre o simbióticos. Dentro de estos últimos se puede observar, en muchos casos, la formación de estructuras especializadas como resultado de la interacción entre estos microorganismos y plantas específicas. Un ejemplo de estas estructuras simbióticas son los nódulos que se establece como producto de la interacción entre las leguminosas y las bacterias pertenecientes a los géneros de Rhizobium, Bradyrhizobium, y Azorhizobium de la familia Rhizobiaceae.

Las leguminosas son un grupo de plantas muy importantes para el hombre, ya que dada su riqueza nutricional, estos vegeta-

les se cultivan para obtener alimento y forraje (Alexander, 1980); resinas, drogas y recursos industriales como concentrados proteínicos, mucilagos y otras materias primas (Dobereiner, 1968). Se ha propuesto que el 70% de los recursos proteicos del mundo se encuentran en los cereales y en las leguminosas y que el 30% restante proviene de la carne, la leche y huevos, sin embargo, estos últimos son los más explotados en los países en desarrollo (Alexander, 1984). Por esta razón se ha considerado importante aumentar la producción de los cultivos de las leguminosas para solucionar el abasto de recursos proteicos.

Un problema agrícola importante es que los fertilizantes utilizados para incrementar las fuentes de nitrógeno en el suelo tienen costos muy elevados. Para resolverlo se sugirió inocular las semillas de las leguminosas con cepas de bacterias mejoradas, que fijen suficiente nitrógeno para satisfacer las necesidades del hospedero. Sin embargo, la simbiosis no siempre es posible ya que la bacteria puede ser incapaz de sobrevivir en el suelo o de competir con otros microorganismos antagónicos. Además algunos rhizobia son numerosos en el suelo pero otros son muy escasos, algunos mueren bajo condiciones de estrés, mientras otros sobreviven durante largos períodos. Por esta razón se han incrementado los estudios sobre la ecología de estas bacterias. Además, el desarrollo de los métodos de trabajo con DNA recombinante en las bacterias proporcionan una alternativa para obtener microorganismos capaces de mejorar el proceso de fijación de nitrógeno. Las técnicas de la ingeniería genética y de genética clásica permiten que los microbiólogos manipulen a los organismos para aumentar su efectividad o que organismos no fijadores de nitrógeno puedan adquirir esta habilidad (Hollender, 1977).

1.1 OBTENCION Y UTILIDAD DE LAS MUTANTES EN EL ESTUDIO DEL FENOMENO DE FIJACION DE NITROGENO. Las técnicas de genética y biología molecular se han introducido al estudio de organismos importantes en la agricultura, debido a que por la gran demanda de alimentos es necesario incrementar la producción, entre otras plantas, de leguminosas (Paredes, 1986). Una manera de estudiar el proceso simbiótico entre las bacterias y las leguminosas es por medio de la manipulación genética. Debido a que es más sencillo manipular los genes de las bacterias que el de las plantas, a la fecha tienen bacterias modificadas genéticamente que detienen la organogénesis del nódulo que son útiles para estudiar algunos pasos de este proceso simbiótico.

A las mutaciones se les clasifica dependiendo del cambio que ocurra en la secuencia del DNA. Un tipo de mutaciones son las puntuales en las que se cambia una base de la secuencia de DNA. Otro tipo de mutación son las deleciones; las cuales se generan cuando una secuencia de DNA se elimina de manera que las regiones laterales a esta región se unen. Las inversiones son cambios cromosómicos en donde el segmento de DNA afectado rota 180° . Finalmente, las inserciones se generan por la adición de bases en un segmento de DNA. Un ejemplo del último tipo de mutaciones son las que realizan los transposones, secuencias de DNA capaces de insertarse en una secuencia blanco de DNA, con la consecuente pérdida de actividad del gen en donde se inserta (Watson, 1983).

Barbara McClintock (1950), en sus estudios sobre el maíz observó el comportamiento de elementos genéticos móviles que inhiben la expresión del gen o genes con los que se pone en contacto (Watson, 1983). A estos elementos se les denominó secuen

cias de corrimiento y no se les dio importancia, hasta varios años después cuando se encontró que en E. coli, existen elementos móviles que son responsables de mutaciones polares, como resultado de la inserción de segmentos de DNA denominados elementos transponibles. Los elementos transponibles son de dos tipos: las secuencias de inserción (IS) que son pequeños segmentos de DNA que codifican su propia transposición y los transposones (Tn) que son grandes segmentos de DNA que portan uno o varios genes bordeados por IS y que se mueven como una sola unidad. Los transposones no tienen un lugar de inserción específico en el cromosoma, sino que se mueven a través del genoma. Ejemplos de estas secuencias son los transposones Tn₂ y el Tn₁₆₈₁ que tiene en sus extremos a la IS₁, la cual se encarga del movimiento del segmento de DNA intermedio (Lewin, 1987).

Para la obtención de mutantes bacterianas se han desarrollado técnicas que aprovechan las funciones de inserción de los transposones. Uno de los transposones más utilizados para la obtención de mutantes en el proceso de fijación de nitrógeno en Rhizobium es el Tn₅. Entre las ventajas que presenta la mutagénesis con el Tn₅ están las siguientes (Berg, 1977)

- 1) no presentan reversión espontánea de la mutación inducida;
- 2) confiere resistencia a kanamicina (Km^R), a neomicina (Neo^R) y en Rhizobium a estreptomycinina (Sm^R) (Martínez, 1987);
- 3) se inserta en posiciones al azar y
- 4) en general causa mutaciones polares.

Recientemente, para facilitar la transferencia del Tn₅ a Rhizobium en experimentos de mutagénesis, el transposón se insertó en un plásmido "suicida", el cual se caracteriza por su capacidad de replicarse solo en E. coli y no en otra bacteria gram-negativa. En los huéspedes en donde la replicación del

plásmido no es posible, la supervivencia del transposón depende de su inserción en el DNA del huésped (Beringer, 1978). Un ejemplo de estos plásmidos "suicidas" es la serie de vectores denominados pSUP que fueron diseñados para transferirse por conjugación entre bacterias gram-negativas. A pSUP se le ha insertado un transposón (Tn_5) y una secuencia de movilización mob que es el ori T de los plásmidos Pl, gracias a la cual puede transferirse a Rhizobium por medio de conjugación. El pSUP también posee un origen de replicación que funciona únicamente en E. coli, de esta manera cuando se transfiere a Rhizobium no se puede replicar lo que se elimina y el Tn_5 persiste sólo si se inserta al genoma de Rhizobium (Martínez, 1987)

Para transferir de una bacteria a otra secuencias de DNA que no tienen la capacidad de hacerlo independientemente, se utilizan plásmidos intermediarios. Por ejemplo el plásmido denominado pJB3JI (plásmido derivado del R68.45), que presenta resistencia a tetraciclina Tc^R y Carbacilina Gb^R y sensibilidad a Km, (Brewin, 1980) se utiliza con este propósito, ya que posee los genes de transferencia tra, cuyos productos actúan en cuatro diferentes funciones: a) inhiben la conjugación entre las células donadoras; b) contribuyen a la expresión del pili filamento por medio del cual se establecen contacto la célula donadora con la receptora; c) estabilizan la asociación entre el donador y el receptor; d) participan en las funciones de el corte y transporte de una cadena sencilla del DNA a la célula receptora. Además para la transferencia es necesario el origen denominado ori T, que se localiza al final de la región tra (Ippen-Ihler, 1986). Sin embargo, el ori T, puede ser complementado en trans por lo que no es necesario que se encuentren jun-

to al resto de los genes tra. De esta manera un plásmido que posea un ori T pero que carece de sus propios genes tra, puede movilizarse con la ayuda de otro plásmido que sí los tiene. Por esta razón al clonar el ori T en la serie de plásmidos pSUP se pueden movilizar los plásmidos del tipo P1 con la ayuda del pJB3JI.

1.2 ESTUDIO DE LA SIMBIOSIS PLANTA-RHIZOBIUM. Como mencionamos anteriormente con la obtención de mutantes de Rhizobium se estudian los pasos para la formación del nódulo y la fijación de nitrógeno. Puesto que nuestro trabajo se centra en los primeros pasos para la formación del nódulo describiremos detalladamente.

A las bacterias capaces de nodular y de fijar nitrógeno en las leguminosas se les agrupa dentro de la familia Rhizobiaceae. Dentro de este grupo existen tres géneros que se diferencian entre otras cosas por su velocidad de crecimiento en medio rico y de su especificidad de infección. Estos géneros son Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium. Se ha observado que una de las características de formación del nódulo por estas bacterias es que su carácter es especie-específico, ya que cada especie bacteriana puede formar el nódulo en un rango limitado de plantas, por ejemplo, R. meliloti infecta a la alfalfa, R. phaseoli al frijol, R. trifolii al trébol, R. leguminosarum al chícharo y Bradyrhizobium japonicum a la soya (Vincent, 1980).

Se ha estudiado que el proceso simbiótico se lleva a cabo en diferentes etapas, y aunque existen diferencias para la formación del nódulo entre los diferentes sistemas Rhizobium-leguminosa los pasos generales son los siguientes: Al inicio del proceso las bacterias son estimuladas por los flavonoides y otros exudados de la planta mandando una señal al meristemo vege

tal para que se inicie la formación del nódulo (Redmond, 1986). Después las bacterias son atraídas hacia las raíces de las plantas y se unen a los pelos radicales menos desarrollados (Bauer, 1985). Los pelos radicales se enroscan en forma de cayado de pastor y atrapan a la (s) bacteria (s) en su interior. Las bacterias se multiplican e infectan la parte externa del cayado de pastor y con el material de la pared celular del cayado se forma una estructura tubular llamada hilo de infección. El hilo de infección se ramifica y penetra a las células de la corteza. Las bacterias se liberan y quedan englobadas dentro de membranas peribacteroidales. Las bacterias localizadas en el citoplasma de las células vegetales se diferencian en bacteroide. En esta forma los bacteroides tienen la capacidad de fijar nitrógeno.

Los nódulos funcionales se encuentran formados por varios tipos celulares, su zona más externa se encuentra formada por células de tejido parenquimatoso que se origina del meristemo nodular. La zona meristemática es la región en crecimiento y de donde se van especializando las células en los diferentes tejidos del nódulo. Esta zona determina la forma y el tamaño del nódulo, los cuales se clasifican en: Indeterminados, nódulos de forma cilíndrica y que tienen un sistema abierto que conecta el meristemo nodular con el sistema vascular de la raíz; y los determinados que tienen forma esférica y que tienen un sistema vascular cerrado. La zona bacteroidal se encuentra en el interior del nódulo y está formada por células infectadas y no infectadas. Las células infectadas alojan en su interior a numerosos bacteroides rodeados por membranas peribacteroidales de origen vegetal (Alexander, 1980).

1.3 LOS GENES DE NODULACION. Los genes simbióticos de Rhizobium se han identificado por secuenciación, análisis proteico de mutantes y en algunos casos con análisis proteico. Las especies de Rhizobium de crecimiento rápido poseen uno o más plásmidos de alto peso molecular. Algunos de ellos poseen genes que participan en la simbiosis por ello se les denomina plásmidos simbióticos (pSym). El tamaño de los plásmidos pSym varía desde los plásmidos de R. leguminosarum de 200-300 kilobases (Kb) a los plásmidos de alto peso molecular (1200-1500 Kb) de R. meliloti. Los genes de nodulación (nod) y los genes para la fijación de nitrógeno (nif y fix) en R. meliloti, R. leguminosarum, R. trifolii y R. phaseoli se encuentran en el pSym. En cambio en B. japonicum los genes homólogos se localizan en el cromosoma (Djorjevic, 1987). Se han realizado diferentes estudios en donde se demuestra que las bacterias que pierden el pSym también pierden su habilidad para interactuar con las leguminosas (Truchet et al., 1984; Hookyaas, 1981). Con lo que se concluye que las principales determinantes de la simbiosis están codificados en plásmidos.

Se han identificado dos grupos de genes nod, unos son los que intervienen en las funciones básicas para la formación del nódulo y los otros los que definen la especificidad del hospedero. Los primeros son los genes nodABC y nodD. Se ha observado que el gene nodD, el cual se puede encontrar repetido varias veces en el pSym (Rodríguez- Quiñones, 1987), regula positivamente la expresión de los genes nodABC cuando están presentes los exudados de la planta (Redmond, 1986). El principal inductor de los genes nodD en R. meliloti se aisló de la alfalfa y se identificó como flavona luteína (Peters, 1986). En R. leguminosarum

se demostró que usando los flavonoides comerciales eriodictiol, naringenina, apigenina y luteolina se activan los genes nod a concentraciones en el rango de nanomoles (Zaat, 1987). Se ha observado que los inductores más comunes son las flavonas y, flavononas hidroxiladas, por ej., la 7,4 dihidroxiflavona en trébol; luteolina en alfalfa y apigenina-7-D-glucosa en chicharro (Djorjevic, 1987).

Las mutantes en nodA, nodB o nodC presentan el siguiente fenotipo : no presentan deformación del pelo radical (Had-), no hay formación del hilo de infección (Inf-), ni desarrollo del nódulo (Ndv-) (Kondorosi et al., 1984; Rosenberg et al., 1981; Bender et al., 1987). Sin embargo, no se conoce la función bioquímica de sus productos. También se ha observado que los genes nodABC parecen ser funcionalmente intercambiables entre las diferentes especies de Rhizobium por lo que se les ha denominado genes nod comunes. Además de los genes nodABC se han identificado, formando el mismo operón a los genes nodI y nodJ en R. leguminosarum. Las mutaciones en estos genes causan retraso en la nodulación (Downie, J.A. et al., 1985). Estos genes en B. japonicum se encuentran separados de los genes nodABC (Nieuwkoop, A.J. et al., 1987) pero aun no se han aislado las mutantes en esta región.

El otro grupo de los genes nod son los que determinan la especificidad y el desarrollo temprano del nódulo. Estos genes se han aislado de diferentes especies de Rhizobium, pero esencialmente este grupo está formado por los genes nod EF (Djorjevic, 1987). Las mutantes en los genes nod EF impiden que la bacteria nodule normalmente causando una deficiencia en el desarrollo del nódulo (Ndv^d) sin la formación del hilo de infección (Inf-) (Debelle et al., 1986; Djorjevic et al., 1985). El análisis

sis de la secuencia de DNA en los genes nodEF demostró que son altamente homólogos en R. leguminosarum y en R. meliloti. Por otra parte el análisis de las proteínas que sintetiza el gene nodF demostró que este gene es similar a una proteína acarreadora de grupos acilo de E. coli. Shearman (1986) sugirió que este gene puede intervenir en la acetilación o en la síntesis de ácidos grasos o de lipopolisacáridos de la bacteria. La función de el gene nodE se desconoce. En R. meliloti se identificó otro gene esencial para la determinación de la especificidad del hospedero, el gene nodH. Las mutantes en este gene no forman hilos de infección ni nódulos en alfalfa pero pueden inducir nódulos en dos especies de Vicia (Hovarth et al., 1986).

Los genes nod que he descrito se encuentran en la mayoría de las especies de Rhizobium, sin embargo, se ha estudiado que existen genes nod característicos de cada especie. Por lo que se siguen realizando trabajos para buscar otros genes nod implicados en la nodulación y en la especificidad.

1.4 EL PAPEL DE LOS POLISACARIDOS Y LIPOPOLISACARIDOS DE RHIZOBIUM EN EL PROCESO DE INFECCION. En el proceso de infección de Rhizobium en las leguminosas, participan moléculas producidas por ambos organismos. Recientemente se le ha dado gran interés al estudio de los exopolisacáridos (EPS), β -(1-2)-glucano y a los lipopolisacáridos (LPS), ya que se sugiere que intervienen en los primeros estadios del desarrollo del nódulo.

Se ha sugerido que los LPS intervienen en el reconocimiento específico Rhizobium-leguminosas, en donde se supone que una lectina específica de las raíces de las leguminosas se une a los LPS. Sin embargo, se han reportado resultados contradictorios acerca de esta unión entre el LPS y las lectinas (Kamber-

ger, 1979; Fueppke, 1984). Los LPS se componen de una fracción lipídica (lípidio A), un polisacárido (PS1 o antígeno O) y un oligosacárido (PS2), aunque existe una gran variación en su composición entre diferentes cepas.

Algunas mutantes de R. meliloti y de R. phaseoli defectuosas en sus LPS no poseen la capacidad de entrar a la raíz. La mutante fix21 de R. meliloti deficiente en la producción de lipopolisacáridos (LPS-) forma hilos de infección abortivos (Hanks etal., 1987). En R. phaseoli una mutante que carece de antígeno O induce la formación del cayado de pastor y del hilo de infección pero las bacterias no invaden el nódulo (Noel et al. 1986). Por lo que se ha sugerido que los LPS tienen un papel relevante en la morfogénesis del nódulo.

También se ha estudiado el papel de los EPS por medio de la obtención de mutantes diferentes especies de Rhizobium. Las colonias de las mutantes que han perdido su mucosidad característica (fenotipo Muc-) presentan defectos en la síntesis de sus EPS, por lo que no se unen al calcofluor. El calcofluor es un colorante fluorescente que se liga a las uniones β 1-3 y β 1-4 de los polisacáridos (Leigh et al., 1985; Finan et al., 1985). Los estudios realizados en R. meliloti han determinado que las mutantes que no sintetizan los EPS denominado succinoglucano o que tienen modificada la estructura del mismo forman nódulos inefectivos. No es necesaria la síntesis de los EPS para la proliferación de las células de la raíz que forman el nódulo, ya que la inducción de los genes nod se realiza cuando las bacterias todavía están distantes de la raíz (Finan et al., 1985).

El succinoglucano es un polímero de subunidades octasacáridos que contienen 7 unidades de glucosa y una de galactosa con

uniones β , así como un carboxietilideno (piruvato). Cada subunidad posee aproximadamente un grupo succinil y un grupo acetil en sitios indeterminados (Aman *et al.*, 1981; Jansson *et al.*, 1977) (Fig. 1). Por medio de un análisis genético detallado en *R. meliloti* se han podido identificar una serie de loci que intervienen en la síntesis de los EPS. Las mutantes de *R. meliloti* son las siguientes: las mutaciones en los genes exoA, exoB, exoC, exoE, exoF, exoH, exoK, exoO y exoJ impiden completamente la síntesis del EPS succinoglucano y dan como resultado la inducción de nódulos vacíos (Fix⁻) (Long *et al.*, 1988); las mutantes exoH carecen del grupo succinil del succinoglucano, no presentan fluorescencia con el calcofluor y también forman nódulos vacíos (Leigh *et al.*, 1987); las mutantes exoG y exoJ presentan poca fluorescencia con el calcofluor, producen poco (exoJ) o nada (exoG) de la fracción del succinoglucano de alto peso molecular, inducen nódulos que fijan nitrógeno deficientemente (Long *et al.*, 1988). Se identificaron también otros dos loci el exoR y el exoS cuyos productos poseen un papel negativo en la regulación de la síntesis de EPS (Doherty *et al.*, 1988); las mutantes exoD y exoK tienen alterada la producción de los EPS pero no tienen el efecto en el desarrollo del nódulo. En *R. meliloti* se observó que los genes exoA, exoB, exoF, exoH y exoK están localizados en el megaplásmido que no porta los genes nif y nod de *R. meliloti* mientras que los genes exoC y exoD se encuentran en el cromosoma (Leigh, 1985; Leigh *et al.*, 1987; Finan *et al.*, 1986).

Se sugirió que los defectos simbióticos pueden resultar la ausencia del precursor octasacárido durante la síntesis del succinoglucano o en la polimerización (se han reportado defectos en el succinoglucano por la falta del grupo succinil (Leigh *et al.*, 1987) o del grupo piruvato (Muller *et al.*, 1988).

Es posible que un EPS tenga mas de un papel en la simbiosis y esto se puede apoyar con los resultados obtenidos con la mutante exoG que produce solamente una fracción del EPS de bajo peso molecular y forma el nódulo con una eficiencia reducida, en cambio la mutante exoA que no produce EPS de ningún tipo forman nódulos vacíos inefectivos. Por lo que se sugirió que existen diferentes papeles para las formas de alto y bajo peso molecular de los EPS.

En estudios recientes se demostró que R. meliloti posee la capacidad de sintetizar un segundo EPS (EPS II) el cual se sugirió que posee la capacidad de sustituir el succinoglucano (EPS I) en la infección y en el nódulo únicamente cuando R. meliloti interactúa con Medicago sativa pero no se observó con ningún otro hospedero (Galzebrook J. & Walker, G., 1989). En otro estudio realizado por Zhan (1989) con R. meliloti se analizaron y caracterizaron mutantes que producen otro EPS (EPSb) y se observó que también pueden sustituir al succinoglucano durante la infección.

En R. phaseoli se aisló una mutación en el gene llamado psb que afecta la síntesis de EPS, se localizó fuera del plásmido simbiótico y se observó que no tiene efecto en la simbiosis. Sin embargo, el pSym de esta mutante se sustituyó por el pSym de R. leguminosarum y se observó que fue incapaz de nodular pero el efecto fue corregido introduciendo una clona de Xanthomonas campestris con los genes exo (Borthakur et al. 1986). Por lo que se concluye que los EPS afectan la simbiosis en R. leguminosarum pero no a R. phaseoli. También en estas especies se han descrito dos genes que se localizan en el pSym y que parecen tener un papel regulatorio en la producción de los EPS durante la simbiosis. El gene psj, cuando se encuentra en multicopia inhibe la síntesis de EPS y parece

afectar el desarrollo del nódulo. También se estudió que el ge ne par restaura la síntesis de EPS cuando se encuentra también en multicopia (Borthakur, 1986; Borthakur & Johnston 1987).

En la cepa NGR 234 de R. sp. se observó que las mutantes EPS- formaron nódulos normales con algunas leguminosas pero tumores deformes en otras. Djorjevic et al., (1987) logró co rregir los defectos en la síntesis de los EPS en las mutantes de esta cepa añadiendo el polisacárido purificado de la cepa silvestre.

A pesar de los estudios realizados en los EPS no se ha podido determinar el papel exacto de los EPS en el proceso simbiótico, por lo que se siguen realizando estudios en las diferentes especies. Como ya mencionamos en R. phaseoli se determinó que los EPS no tienen ningún efecto sobre el proceso simbiótico. Sin embargo, se sabe que la cepa CIAT-899 de R. phaseoli presenta una organización genética muy diferente a las demás cepas de R. phaseoli. Por esta razón en este trabajo nos propusimos estudiar el efecto de los EPS en el proceso simbiótico entre CIAT-899 y Phaseolus vulgaris. Se obtuvieron mutantes deficientes en la producción de EPS que formaron nódulos incipientes y vacíos y otra mutante con morfología Muc^+ que tiene la capacidad de formar nódulos infectados y parecidos a los de la cepa silvestre.

4, 6-O-(1-carboxietilideno) Glc(β1→3 Glc(β1→3 Glc(β1→
 6 Glc(β1→6 Glc(β1→4 Glc(β1→4 Glc(β1→3 Gal(β1→
 4

Fig. 1 Estructura del EPS succinoglucano polímero de subunidades octasacáridas que contiene 7 unidades de glucosa y una de galactosa con uniones β, así como un carboxietilideno (piruvato), cada subunidad posee un grupo acetil y un grupo succinil en sitios indeterminados (Aman et al., 1981; Jansson, 1977).

2. JUSTIFICACION DEL PROYECTO

En México el cultivo del frijol ocupa el segundo lugar en importancia, por lo que se destinaron 1 530 000 hectáreas (Noti - SARH, 1981), lo que indica que el estudio de métodos para aumentar la productividad sería de interés desde el punto de vista económico y de nutrición. Se sugiere que una manera de aumentar la producción de este cultivo es por la inoculación suplementaria de bacterias fijadoras de nitrógeno, manipuladas genéticamente, con el fin de incrementar su efectividad, es decir, la capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno en las leguminosas. Por esta razón es importante el estudio del proceso de infección de R. phaseoli en Phaseolus vulgaris.

Por las diferencias encontradas en la organización genética de diferentes cepas de R. phaseoli se decidió dividir a esta especie en dos tipos: el tipo I son bacterias que presentan reiteración del gene nifH y únicamente forman nódulos efectivos en Phaseolus. En cambio el tipo II (CIAT-899, CFN-299 y UMR-1020) no presentan reiteración del gene nifH y forman nódulos efectivos en Phaseolus y nódulos inefectivos en Leucaena (Martínez, 1985). Por otra parte se observó que las cepas del tipo II muestran poca homología de bases con la región nod-nif de las cepas tipo I (Brom, 1988). Las cepas del tipo II, CIAT-899 y CFN-299, además presentan características comunes como son la resistencia a pH ácido y a concentraciones elevadas de aluminio (Martínez, 1985).

En la introducción se mencionó la importancia que tienen los exopolisacáridos durante el proceso de infección. Sin embargo, en R. phaseoli del tipo I se observó que la ausencia de EPS no afecta la simbiosis (Bortakur, 1986). Debido a que los

dos tipos presentan una organización genética diferente, en este trabajo hemos decidido utilizar la cepa CIAT-899 para observar el papel de los EPS en las bacterias del tipo II. También se observó que la pérdida del plásmido simbiótico en la cepa CIAT-899 le confiere un fenotipo poco mucosoide (Muc-) (comunicación personal con el CIPN) y que las transconjugantes de A. tumefaciens curadas, que carecen del plásmido Ti, a las que se les transfirió el plásmido simbiótico de CIAT-899 adquirieron la habilidad de nodular y además de fijar nitrógeno (Martínez, 1985). Por lo tanto se sugiere que en el plásmido simbiótico se localizan los genes nod, nif y exo de la cepa CIAT-899.

Trabajar con la cepa CIAT-899 ofrece muchas ventajas ya que además de ser una cepa que fija eficientemente nitrógeno, es tolerante a pH ácido (4.15-4.9), a altas concentraciones de sal (aproximadamente 0.2 M), manganeso (50 ppm) y aluminio (6ppm) (Graham, 1981), lo que la hace una cepa ideal para usarse como inóculo en suelos con altas concentraciones de estos elementos o en suelos ácidos, por ejemplo en suelos en lo que alguna vez fueron selvas (i.e. algunos pastizales de Tabasco).

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de los exopolisacáridos en el proceso de infección de la cepa CIAT-899 en Phaseolus vulgaris.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener mutantes de CIAT-899 deficientes en la producción de EPS por medio de la inserción del elemento Tn5_{mob}.
- 2.- Caracterizar a las mutantes deficientes en la producción de EPS (Exo-), en su capacidad de formar nódulos.
- 3.- Localizar los transposones Tn5_{mob} en el genoma de las mutantes Exo-.

4. ESTRATEGIA

Para cumplir con los objetivos del proyecto nos planteamos la siguiente estrategia de trabajo:

- Se mutagenizó con Tn5mob a la cepa CIAT-899 (Rif^R) y se obtuvieron derivados Km^R.

- Se seleccionaron mutantes con morfología Muc- en medio Ym y se probó su afinidad por el calcofluor.

- Con el fin de diferenciar entre las mutantes cromosomales y las plasmídicas se transfirió el Tn5mob (Km^R) a bacterias Agrobacterium tumefaciens curadas (cepa C58C1EC). Únicamente se pueden obtener transconjugantes con las mutantes que tengan el Tn5mob en el plásmido.

- Por último se realizó la caracterización preliminar de los fenotipos de nodulación y efectividad de las mutantes.

5. METODOLOGIA

5.1 Bacterias y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla I. Estos fueron donados por el CIPN-UNAM.

5.2 Medios y condiciones de crecimiento bacteriano

La composición de los medios de cultivo se detallan en la tabla II y III. Los reactivos utilizados para preparar los medios fueron de la marca Bioxón.

- E. coli y A. tumefaciens se crecieron en medio LB (Miller 1972).

- La cepa CIAT-899 y sus derivados se crecieron en medio Py (Noel et al., 1984) o en medio Ym (Vincent, 1970), adicionados cuando se requirió con los siguientes antibióticos: Rifampicina (Rif) 50 g/ml; Kanamicina (Km) 30 g/ml; Estreptomocina (Sm) 20 g/ml; Carbamicilina (Cb) 30 g/ml; Eritromicina (Ery) 30 g/ml; Cloranfenicol (Cm) 30 g/ml.

5.3 Aislamiento de mutantes obtenidas por medio de la inserción del Tn5mob.

Se tomaron 0.1 ml de cultivos en fase estacionaria de CIAT-899 (receptores) y de E. coli SM 17-1 (donadores). Se mezclaron y plaquearon sobre cajas de Py que se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Las bacterias obtenidas se resuspendieron en agua estéril, se hicieron diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} y se plaquearon en el medio selectivo Ym Rif Km.

Las cepas que mostraron un fenotipo no mucoso en el medio de selección se purificaron y se comprobó su afinidad con el calcofluor.

5.4 Prueba de tinción con calcofluor

Para comprobar que las mutantes de Rhizobium eran incapaces de producir EPS se realizó la prueba de tinción con calcofluor.

Las mutantes Muc⁻ se picaron con un testigo Muc⁺ en Py sólido con 0.02% de calcofluor y se incubaron a 30°C durante 48 h. El complejo formado por el calcofluor al unirse al EPS de la pared de las cepas Muc⁺ al exponerse a la luz U.V. fluoresce (Leigh et al., 1985).

5.5 Formación de nódulos

El fenotipo de nodulación de las mutantes se analizó con el método siguiente: las semillas de frijol "Canario 107" se esterilizaron sumergiéndoles en hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. Las semillas se incubaron en tubos de ensaye con 1 ml de cultivo líquido en fase log de cada una de las bacterias mutantes hasta que germinaron y se sembraron dos semillas por botella en el sistema jarra-botella de Leonard modificado (Vincent, 1970). Se utilizó como sustrato agrolita a la que se ajustó el pH 6-7 y solución nutritiva de Jensen (pH 6.5-7) (Tabla IV) (Vincent, 1970). Las plantas se colocaron por espacio de 20 días bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo de 12 h luz y 12 h obscuridad, a 25 °C con una humedad relativa de 58%. Después de este tiempo se observó si las mutantes nodularon y si formaron nódulos efectivos.

De los nódulos que se formaron se obtuvieron a las bacterias de la siguiente manera: un nódulo de cada planta se esterilizó con hipoclorito de sodio 1% en un tubo de ensaye estéril, después se lavó cinco veces con agua destilada, se machacó el nódulo con una varilla de vidrio estéril. De este sobrenadante

dante se hacen diluciones y se siembran en medio Py y Ym RifKm.

5.6 Transferencia de material genético de *Rhizobium* a *A. tumefaciens*.

Para localizar el transposón Tn5_{mob} dentro del cromosoma o el plásmido de las mutantes Exo⁻ se realizó la transferencia del material genético de CIAT-899::Tn5_{mob} a *A. tumefaciens* de la manera siguiente:

Las mutantes Exo⁻ se conjugaron en Py sólido con la cepa 1830 que posee el plásmido pJB3JI (Sm^RTc^RCb^R) (Beringer, 1978). Las transconjugantes se cultivaron en el medio de selección Py Rif Tc y se conjugaron con *A. tumefaciens* C58C1EC en LB. Después se seleccionaron las bacterias con los antibióticos Bry , Cm y Km.

Tabla I

ORIGEN Y CARACTERISTICA DE LAS BACTERIAS Y LOS PLASMIDOS

Cepas bacterias o plásmidos	Características relevantes	Referencia
Cepas		
<u>R. phaseoli</u> CIAT-899	Tipo II (no reiterado en <u>nif</u>) Rif ^R NaI ^R Sal ^R Al ^R Mn ^R resistente a pH ácido	Brom, 1988
CE-3	Tipo I (reiterado en <u>nif</u>) derivado de la cepa silvestre CFN42 Sm ^R	Noel, 1984
<hr/>		
<u>E. coli</u>		
Sm 17-1	294 recA, derivado RP4 integrado en el cromosoma	Simon, 1983
HB101	Sm ^R F ⁻ , <u>hds20</u> , <u>rec</u> <u>Al3</u> , <u>ara14</u> , <u>proA2</u> , <u>lac</u> <u>Y1</u> , <u>galK2</u> , <u>rpsL20</u> , <u>xy</u> 15, SUP E44	Boyery Roulland Dussaix D., 1969
1830	Sm ^R <u>pro</u> , <u>met</u>	Beringer, 1978
<hr/>		
<u>A. tumefaciens</u>		
C58C1EC	Ery ^R Cm ^R curada del plásmido Ti	Holsters, 1980
<hr/>		
Plásmidos		
pSUP 5011	Tipo P con un sitio de reconocimiento para la movilización	Simon, 1983
pJB3JI	derivado del R68.4 tra ⁺ Tc ^R Cb ^R	Simon, 1983

Tabla II

MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA Rhizobium

Py (Noel et al., 1984)

Peptona de caseína	5 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de calcio	7 mM*
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

* Se esteriliza a parte y después se agrega al medio.

Ym (Vincent, 1970)

Fosfato de potasio monobásico	0.5 g
Fosfato de potasio dibásico	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Cloruro de sodio	0.1 g
Cloruro de calcio	0.04g
Extracto de levadura	1 g
Manitol	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Tabla III

MEDIO DE CRECIMIENTO PARA E. coli Y A. tumefaciens

LB (Miller, 1972)

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Tabla IV

MEDIO JENSEN (Vincent, 1970)

Fosfato de calcio monobásico	1.00 g
Fosfato de potasio dibásico	0.2 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Cloruro de sodio	0.2 g
Cloruro férrico	0.2 g
Solución de oligoelementos	1.00 ml
Agua destilada (aforar)	1.00 ml
pH 6.5 - 7	

SOLUCION DE OLIGOELEMENTOS

Acido bórico	0.5 g
Sulfato de zinc	0.5 g
Sulfato de cobre	0.02 g
Molibdato de sodio	0.05 g
Agua destilada	1 1
pH 6.5 - 7	

6. RESULTADOS

Mutagénesis de CIAT-899 con el transposón Tn5mob

Se mutagenizó la cepa CIAT-899 con el Tn5mob por el método antes descrito. De las transconjugantes que crecieron en el medio Ym Rif Km se aislaron las mutantes que formaron colonias poco mucosas (Muc-) (Fig. 2). De tres diferentes experimentos de mutagénesis se aislaron 6 mutantes cuya morfología colonial fue poco mucosa y transparente, y se obtuvo una con fenotipo Muc⁺, que se clasificó con este fenotipo ya que su morfología colonial fue más mucosa que las otras mutantes y el color de las colonias blanco. Sin embargo, esta colonia se podía diferenciar de la cepa silvestre de morfología mucosa (Muc⁺). A las mutantes se les denominó MSB-V-01 a la 07.

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{Número de mutantes totales}}{\text{Número de mutantes Muc-}}$$

De una de los experimentos de mutagénesis se calculó una frecuencia de 2.7×10^{-3}

Prueba de tinción con calcofluor

Para demostrar que el fenotipo Muc- se debe a la falta de producción de EPS las mutantes se picaron en medio Py sólido con 0.02% de calcofluor con un testigo Muc⁺. Se observó que todas las mutantes Muc⁺ y la Muc- son negativas en su fluorescencia (colonias oscuras) en contraste de la colonia de CIAT- 899 Muc⁺ (colonia brillante) incluida como control (Tabla V)(Fig.4).

Formación de Nódulos

Los siguientes resultados fueron obtenidos por Graciela Martínez la cual montó el sistema jarra-botella de Leonard en la USB. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V en donde se puede observar que las mutantes Muc⁻ formaron nódulos pequeños y blanquecinos a diferencia de la mutante Muc⁺ denominada MSB-V 03 que formó nódulos tipo silvestre de aproximadamente 4 mm y de color rojizo.

Se pudieron obtener bacterias sólo de los nódulos formados por CIAT-899 (Rif^R) las cuales conservaron su fenotipo Muc⁺ y su resistencia a la rifampicina y la mutante MSB-V-03 (Rif^RKm^R) que conservó su fenotipo Muc⁺ y también su resistencia a kanamicina y rifampicina (Tabla VI).

Transferencia del material genético de CIAT-899 a A. tumefaciens

En los experimentos de conjugación de las mutantes MSB con la cepa 1830 se obtuvieron recombinantes de todas las mutantes. Esto nos sugiere que el transposón Tn_{5mob} se insertó en el plásmido de la cepa CIAT-899 lo que permitió su transferencia en contraste si se hubiera insertado en el cromosoma.

Tabla V

FENOTIPOS DE CIAT-899 Y MUTANTES BXO-

Bacterias	Fenotipo Muc	Calcofluor	Nodulación
CIAT-899	+	+	+
MSB-V-01	-	-	-
MSB-V-02	±	-	-
MSB-V-03	-	-	+
MSB-V-04	-	-	-
MSB-V-05	-	-	-
MSB-V-06	-	-	-
MSV-V-07	-	-	-

Las mutantes MSB se cultivaron por 48 h en medio Py con 0.02% de calcofluor. Las colonias se observaron bajo luz U.V. y se registró su fenotipo.

Tabla VI

MODULACION DE LAS MUTANTES EXO-

Cepa	Tiempo de Aparición de Nódulos	Coloración de los Nódulos	Presencia de Bacteroides
GIAT-899	15 días	rojizos	+
MSB-V-01	8 semanas	blanquecinos	-
MSB-V-02	"	"	-
MSB-V-03	15 días	rojizos	+
MSB-V-04	8 semanas	blanquecinos	-
MSB-V-05	"	"	-
MSB-V-06	"	"	-
MSB-V-07	"	"	-

Raíces de Phaseolus vulgaris "Canario 107" colocadas por espacio de 20 días en condiciones estériles inoculadas con Rhizobium por medio del sistema jarra botella de Leonard y se registro que a los 15 días aparecen nódulos.

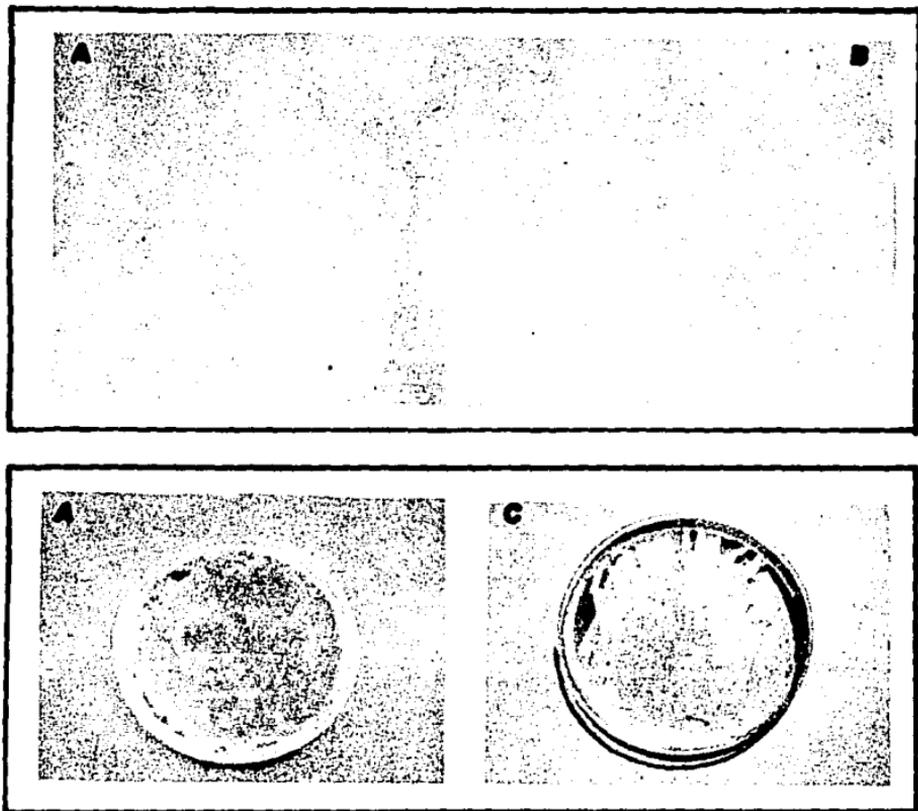


Fig. 2 MUTANTES DEFICIENTES EN LA PRODUCCION DE EPS

La cepa CIAT-899 (Rif^R) se mutagenizó con el transposón $Tn5_{mob}$. De las transconjugantes que crecieron en el medio Ym RifKm se aislaron mutantes que formaron colonias poco mucosas Muc^- (B). Se obtuvo una mutante con fenotipo Muc^+ (C) ya que su morfología colonial fue más mucosa que las de las otras mutantes, sin embargo, se podía diferenciar de la cepa silvestre de morfología mucosa Muc^+ (A).

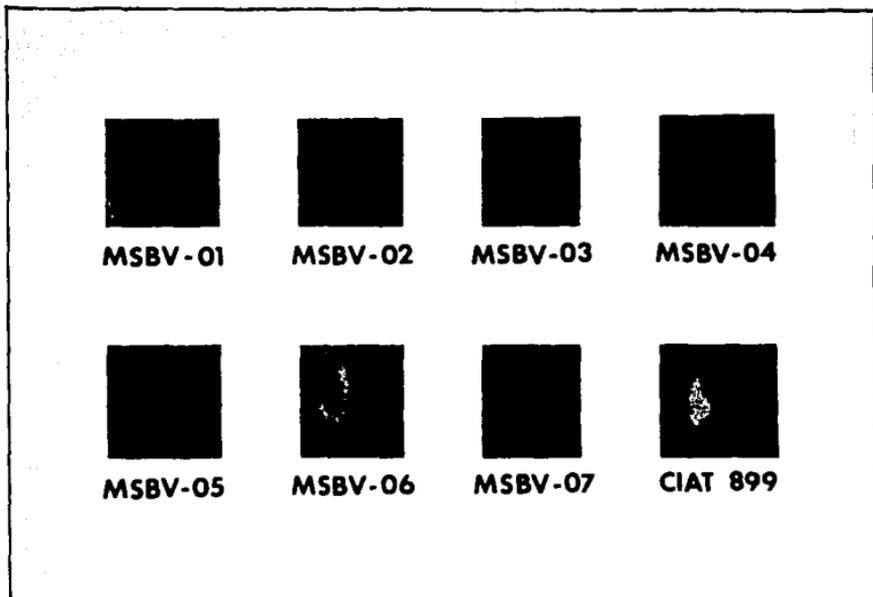


Fig. 3 PRUEBA DE TINGION CON CALCOFLUOR

Para demostrar que el fenotipo Muc^- se presenta debido a la falta de producción de EPS se realizó la prueba de tinción con calcofluor (Leigh, 1985). En medio Py sólido con 0.02% de calcofluor, se picaron las mutantes Muc^- y CIAT-899 Muc^+ . Al alumbrar las colonias formadas a las 72h con la luz U.V. se observó que las mutantes Muc^- son negativas en su fluorescencia en contraste con la colonia de CIAT-899 Muc^+ incluida como control, que sí desprende fluorescencia.

7. DISCUSION

Recientemente para estudiar las funciones de los exopolisacáridos que biosintetizan las bacterias del género Rhizobium se han obtenido mutantes Exo- en R. meliloti (Finan, 1985 ; Leigh, 1985); R. leguminosarum (Napoli, 1980; Puhler, 1988) ; Rhizobium sp. cepa NGR 234 (Djorjevic, 1987; Chen, 1988); R. trifolii (Chakravorti, 1982; Djorjevic, 1987) y R. phaseoli (Borthakur, 1986; Noel, 1986; Vandenbosch, 1985). En las cepas del tipo I de R. phaseoli se observó que la ausencia de los EPS no afecta el proceso de infección. Sin embargo, se ha estudiado que la organización genética de las bacterias del tipo II es muy diferente a las del tipo I (Brom et al., 1988) y por lo tanto el papel de los EPS puede ser también diferente para cada uno de los grupos.

En este trabajo se aislaron y caracterizaron 7 mutantes Exo- derivadas de la cepa CIAT-899 (Rif^R) perteneciente al grupo de las bacterias del tipo II de R. phaseoli. Para la obtención de estas mutantes se midió la frecuencia en una de las 3 mutagénesis realizadas y fue de 2.4×10^{-3} . Se pudo observar que la frecuencia normalmente presenta el Tn5mob es de 10^{-5} . Esta frecuencia tan elevada puede sugerir que al mutagenizar los genes que codifican para la morfología colonial poco mucosa de la bacteria CIAT-899 presente características especiales como son las siguientes: que el número de locus que codifican para el fenotipo Muc⁺ es muy elevado aumentando por esta razón la frecuencia de la mutagénesis o que el Tn5mob reconozca de alguna forma a los genes de CIAT-899 que codifican el fenotipo Muc⁺ y que por lo tanto la inserción no sea al azar.

Se observó que las mutantes obtenidas en este trabajo a excepción de la mutante MSB-V-03, presentaron una morfología colonial poco mucosa y transparente, por lo que se les designó el fenotipo Muc⁻. La mutante MSB-V-03 a diferencia de las anteriores presentó una morfología colonial más mucosa y el color de las colonias fue blanco. Sin embargo, la morfología colonial fue menos mucosa que el de la cepa silvestre (Muc⁺), por lo que se le designó el fenotipo Muc⁺. Las mutantes que presentan una morfología poco mucosa son deficientes en la síntesis de EPS o de lipopolisacáridos (LPS). Las mutantes Muc⁻ obtenidas en R. phaseoli del tipo I eran capaces de unirse al calcofluor (Noel, 1986) y más tarde se encontró que estas mutantes eran deficientes en la producción del LPSI (Cava, 1989). Por esta razón fue importante caracterizar a las mutantes en su unión al calcofluor, ya que por ejemplo Leigh (1985) observó que el calcofluor reconoce las uniones β del EPS succinoglucano. De esta manera se sugirió que dependiendo de la estructura que presente el EPS formado por las mutantes seran o no capaces de unirse al calcofluor.

Por los estudios realizados en mutantes Exo⁻ de R. meliloti se sugirió que la falta de unión con el calcofluor se debe a la falta de EPS como es el caso de las mutantes exoA, exoB, exoC y exoF. Estas mutantes se observó que presentan colonias oscuras en presencia de calcofluor y no producen EPS, por lo que las mutantes formaran nódulos inefectivos (Leigh, 1985). A estas mutantes MSB-V, excepto la MSB-V-03, las cuales presentaron un fenotipo Muc⁻ y también fueron deficientes en su unión con el calcofluor, por lo que se sugiere que no producen EPS. Las mutantes nodularon en Phaseolus vulgaris pero los nódulos fue-

ron más pequeños que los de la cepa silvestre y de color blanquecino, además de que no pudieron recuperar bacterias de los formados por estas mutantes. Por esta razón se sugiere que las mutantes Muc- fueron incapaces de infectar a la planta y además que forman nódulos inefectivos al igual que las mutantes de R. meliloti.

A la mutante MSB-V-03 la podemos comparar con otras dos mutantes derivadas también de R. meliloti conocidas como exoN y exoK que producen pocos EPS, no se unieron con el calcofluor pero fueron capaces de formar nódulos efectivos. La mutante MSB-V-03 presentó una morfología colonial poco mucosa y las colonias fueron de color blanco por lo que se sugirió que forman pocos EPS y al igual que las mutantes exoK y exoN no se une al calcofluor. Sin embargo, los nódulos que formó esta mutante presentaron características morfológicas muy parecidas a la de la cepa silvestre, su tamaño fue aproximadamente de 4mm, su coloración fue rojiza y se pudieron recuperar bacterias de estos nódulos. Se ha observado que la coloración rojiza es característica de los nódulos efectivos, por lo tanto se sugiere que la mutante MSB-V-03 forma dichos nódulos. Aunque es necesario que se mida la actividad de la enzima nitrogenasa para determinar si realmente estas mutantes forman o no nódulos efectivos.

En este trabajo se sugirió que la mutante MSB-V-03 presenta fenotipo Luc^+ por la presencia de EPS, por lo tanto es necesario aislar y analizar su estructura para determinar su diferencia con los EPS silvestres. Recientemente Zhan et al. (1989) encontraron mutantes de R. meliloti que no producen el EPS succinoglucano, sin embargo, las mutantes sintetizaron otro EPS denominado EPSb que reemplazó al succinoglucano en el proceso de infección por lo que fueron capaces de formar nódulos efectivos. Si al anali

zar los EPS de la mutante MSB-V-03 se observará que no es succinoglucano esta podría ser la razón para explicar porque no se une al calcofluor y que como el EPSb sea capaz de sustituir al succinoglucano.

En estudios recientes de R. phaseoli en cepas del tipo I se observó que las mutantes deficientes en la producción de lipopolisacáridos (LPS) poseen fenotipo Muc⁻ y formaron nódulos inefectivos. Por esta razón es importante estudiar los LPS de las mutantes MSB-V para determinar que el defecto de las mutantes - para la formación de nódulos efectivos es provocado únicamente por los EPS y no por los LPS.

También sería interesante purificar los EPS de la cepa silvestre y observar si añadiéndolos a las mutantes Exo⁻ pueden corregir su defecto y formar así nódulos efectivos. En R. trifolii y en Rhizobium sp. cepa NGR 234 se pudo corregir el defecto de las mutantes Exo⁻ añadiendo los poli u oligosacáridos purificados del sobrenadante de los cultivos de las cepas silvestres (Djorjevic, et al., 1987).

Por último en este trabajo se realizó la transferencia del Tn5mob a la cepa C58C1EC. La hipótesis para este experimento fue que las mutantes capaces de conjugarse con esta cepa serían únicamente las que tuvieran el Tn5mob insertado en el plásmido. Esta hipótesis se propuso por la observación previa de que marcadores encontrados en los plásmidos se conjugan a altas frecuencias a diferencia con la que se transfieren es casi nula (Brewin, 1980).

Todas las mutantes Exo⁻ obtenidas en este trabajo presentaron conjugación con la cepa C58C1EC y por lo tanto se sugiere que el Tn5mob se insertó en un plásmido. Sin embargo, para determinar en que plásmido se encuentra el Tn5mob es necesario

realizar los experimentos siguientes: aislar los plásmidos y por medio de la técnica de Southern blotting localizar y aislar los genes exo se localizan en el plásmidos simbiótico con los genes nif y nod. Esto podría explicar porque las cepas de A. tumefaciens curadas de su pTi a las que se les transfirió el pSym de la cepa CIAT-899 fueron capaces de formar nódulos efectivos. También explicaría porque las cepas CIAT-899 curadas de pSym presentaron una morfología Muc-. Es muy importante continuar con el estudio de esta cepa y determinar si las diferencias genéticas con las demás especies de R. phaseoli la pudieron colocar como una especie aparte.

8. CONCLUSIONES

1.- Se obtuvieron 7 mutantes de R. phaseoli cepa CIAT-899 que presentaron una morfología colonial poco mucóide, 6 Muc⁻ y una Muc⁺.

2.- Se comprobó que la morfología colonial poco mucóide de las mutantes se debe a la deficiencia en la producción de exopolisacáridos.

3.- Se pudo observar que la mutante Muc⁺ puede nodular en Phaseolus vulgaris recuperándose a las bacterias de los nódulos a diferencia de la Muc⁻ cuyos nódulos se encontraban vacíos.

4.- Por la alta frecuencia con que las mutantes conjugaron con A. tumefaciens se sugiere que los genes exo se encuentran en el plásmido.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander, M., 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Ed. AGT. 491 pp.
- 2.- Alexander, M., 1984. Biological Nitrogen Fixation Ecology Technology and Physiology. Plenum Press. London NYA . 247 pp.
- 3.- Aman, F., McNeil, M., Frozen, L., Darvilli, A.G. & Albert sheim, P., 1981. Structural elucidation using HPLC-MS and GLS-MS of the acidic polysaccharide secreted by R. meliloti strain 1021. Carbohydr. Res. 95: 263-282 pp.
- 4.- Bauer, W.D., T.V. Bhuvanawari, H.E. Calvert, I.J. Law, N. S.A. Malik, and S.J. Vesper. 1985. Recognition and Infection by slow growing rhizobia. In H. J. Evans, P. J. Bottomley, and W.E. Newton (ed). Nitrogen fixation research progress. Martinus Nijhoff Publishers Amsterdam. 247-253pp.
- 5.- Bender, G. L. Goydych, W., Rolfe, B.G. & Nayudu, M., 1987 The role of Rhizobium conserved and host specific nodulation genes in the infection of the non-legume Parasponia andersonii. Mol. Gen. Genet. 210: 299-306 pp.
- 6.- Berg, D.E., 1977. Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinants Tn₅. In: DNA insertion elements, plasmids and episomes (A.I. Bukhari, J. A. Shapiro, & S.I. Adhya, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 205-212 pp.
- 7.- Beringer, J.E., Beynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V. & Johnston A.W.B., 1978. Transfer of the drug resistance - transposon Tn₅ to Rhizobium. Nature (London). 276: 633 - 634 pp.

- 8.- Borthakur, D., Barber, J.W., Lamb, M.J., Daniels, J.A. Downie, J., & Johnston, A.W.B., 1986. A mutation that blocks exopolisaccharide synthesis prevents nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum but not of beans by R. phaseoli and is corrected by cloned DNA from Rhizobium or the phytopathogen Xanthomonas. Mol. Gen. Genet. 203: 320-323 pp.
- 9.- Borthakur D., & Johnston A.W.B. 1987. Sequence of psi, a gene on the symbiotic plasmid of R. phaseoli which - inhibits exopolisaccharide synthesis and nodulation and that its transcription is inhibited by psr, another - gene on the symbiotic plasmid. Mol. Gen. Genet. 207: - 149-154 pp.
- 10.- Boyer, H.W., Roulland-Dessouix D., 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of - DNA in Esterichia coli. Mol. Biol. 42: 459-472 pp.
- 11.- Brewin, N.J. Beringer, J.E. & Johnston, W., 1980. Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 120: 413-420 pp.
- 12.- Brom, S., Martínez, E., Dávila, R., Palacios, R., 1988 Narrow and broad host range plasmids of Rhizobium spp. strains that nodulate Phaseolus vulgaris. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1820-1823 pp.
- 13.- Cava, J.R., Elias P.M., Turowski D., & Noel D., 1989. Rhizobium leguminosarum CFN-42 Genetic Regions Encoding Lipopolysaccharide Structures Essential for Complete Nodule Development on Beans Plants. J. Bacteriol. 171 : 8-15 pp.

- 14.- Chakravorty, K.A., Zurkowski, W., Shine, J. et al., 1982
Symbiotic Nitrogen Fixation : Molecular cloning of Rhizo
bium genes involved in exopolysaccharide synthesis and
effective nodulation. J. Mol. App. Gen. 1: 585-596 pp.
- 15.- Chen, H., Gray, J., Nayudu, M., et al. 1988. Five genetic
loci involved in the synthesis of the acidic exopolisac -
charides are closely linked in the genome of Rhizobium sp
cepa NGR 234. Mol. Gen. Genet. 212 : 310-316 pp.
- 16.- Debelle, F., Rosenberg, C., Vasse, J., et al., 1986. -
Assignment of symbiotic developmental phenotypes to co-
mmon and specific nodulation (nod) genetic loci of Rhi-
zobium meliloti. J. Bacteriol. 168: 1075-1086 pp.
- 17.- Djorjevic, S.P., Chen, H., Batley, B., et al., 1987.
Nitrogen fixation ability of exopolisaccharide synthesis
of Rhizobium spp. strain NGR 234 and R. trifolii is res-
tored of homologous exopolisaccharides. J. Bacteriol.
169: 53-60 pp.
- 18.- Djorjevic, M.A., Gabriel, D.W., Rolfe, G.B., 1987 Rhizo
bium the refined parasite of legumes. Ann. Rev. Phytopa-
tol. 25: 145-168 pp.
- 19.- Djorjevic, M.A., Schofield, R.P., Rolfe, G.B., 1985. tn5
mutagenesis of R. trifolii host-specific nodulation ge-
nes result in mutants with altered host-range ability.
Mol. Gen. Genet. 200: 463-471 pp.
- 20.- Dobereiner, J., 1968. Pesq. Agropec. Bras. 3: 1-6 pp.
- 21.- Doherty, D., Leigh, J.A., Glazebrook, J. & Walker, G.C.,
1988. Rhizobium meliloti mutants that produce the R. me-
liloti acidic calcofluor-binding exopolisaccharide. J. -
Bacteriol. 170: 4249-4256 pp.

- 22.- Downie, J.A., Knight, C.D., Johnston, A.W.B. & Rossen, L., 1985. Identification of gene and gene products involved in nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum. Mol.Gen Genet. 198: 255-262 pp.
- 23.- Finan, T.M., Hirsch, H.M., Leight, J.A., et al., 1985. Symbiotic mutants of Rhizobium meliloti that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell. 40: 869-877 pp.
- 24.- Finan, T.M., Kunkel, B., DeVos, G.P. & Singer, E.R., 1986. A second symbiotic megaplasmid in Rhizobium meliloti encodes exopolysaccharide and thiamine genes. J. Bacteriol - 167:66-72 pp.
- 25.- Glazebrook, J. & Walker, G.C., 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti Cell: 661-672 pp.
- 26.- Graham, P.H., Vitteri, S.E., Mackie, F., et al., 1981. Variation in acid soil tolerance among strains of R. phaseoli. Field Crops Res.
- 27.- Hanks, J.F., Macol, L.A., Goldthwaite, J. & Hirsch, A. M., 1987. Analysis of nodule-specific expression in ineffective alfalfa root nodules and callus cultures derived from ineffective root nodules. In: Verma, D.P.S. & Brisson, N., (ed) Molecular genetics of plant microbe interactions. Martinus Nijhoff Boston. 112-114 pp.
- 28.- Hollaender, A., 1977. Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. Plenum press. New York. 530 pp.
- 29.- Holsters, M., Selva, F., Van Vleit, Genetello, M., DeBlock P., Ohaesi, A., et al., 1980. The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTi C58. Plasmid 3: 212-230 pp.

- 30.- Hookyaas, P.J.J., Brussel van A.A.N., Rasden H., et al., 1981. Sym plasmid of R. trifolii expressed in different rhizobial species and Agrobacterium tumefaciens. Nature. 291: 351-353 pp.
- 31.- Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., et el., 1986. Orga nization, structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa. Cell. 46: 335-343 pp.
- 32.- Ippen-Ihler, K.A. & Mickley, E.G., 1986. The conjugation system of F1 the fertility factor of E. coli . Ann. Rev. Genet. 20: 593-664 pp.
- 33.- Jansson, P., Kenne, L., Lindberg, B., Ljunngren, H., Lonngren, J., Ruden, V. & Svensson, S., 1977. Demonstration of octasaccharide repeating unit in the extracellular polysaccharide of R. meliloti by sequential degradation. J. Amer. Chem. Soc. 99: 3812-3815 pp.
- 34.- Kamberger, W., 1979. An ouchterlong doble difussion study on the interaction between legume lectins and rhizobial cell surface antigens. Arch. Microbiol. 121: 83-90 pp.
- 35.- Kondorosi, E., Banfalvi, Z., Kondorosi, A., 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 193: 445-452 pp.
- 36.- Leigh, J.A., Reed, J.W., Hanks, J.F., et al., 1987. Rhizobium meliloti mutants that fail to succinylate their - calcofluor binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. Cell. 51: 579-587 pp.
- 37.- Leigh, A.J., Signer, E.R. & Walker, C.G., 1985. Exopolysaccharide - deficient mutants of R. meliloti that form -

- ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 6231-6235 pp.
- 38.- Lewin, B., 1987. Genes. 3a ed. Wiley. 761 pp.
- 39.- Long, S.R., Reed, J.W., Himawan, J., & Walker, J.G., - 1988. Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide or Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 170: 4239 - 4248 pp.
- 40.- Martinez, E., Pardo, A.M., Palacios, R., & Cevallos, M. A., 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and ni trogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen. Microbiol. 131: 1779 - 1786 pp.
- 41.- Martínez, E., Palacios, R., & Sanchez, F., 1987. Nitrogen fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 169 (6): 2828-2834 pp.
- 42.- Miller, J.H., 1972. Experiments in molecular genetics - Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y. 433 pp.
- 43.- Müller, P., Hynes, M., Kapp, D., et al., 1988. Two classes of Rhizobium meliloti infection mutants differ in exopolisaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. Mol. Gen. Genet. 211: 17-26 pp.
- 44.- Napoli, C.P., Alersheim, 1980. Rhizobium leguminosarum mutants incapable of normal extracellular polysaccharide production. J. Bacteriol. 141: 1454-1456 pp.
- 45.- Nieuwkoop, A.J. Banfalvi, Z. Deshmane, D., Gerhold, D. Schell, M, et al., 1987. A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of Bradyrhizobium

- japonicum. J. Bacteriol. 169: 2631- 2638 pp.
- 46.- Noel, D., Sánchez, A., Fernández, L., 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158 (1) : 148-155 pp.
- 47.- Noel, K.D., vandenbosch, K.A., & Kulpaca, B., 1986. - Mutations in Rhizobium phaseoli that lead to arrested development of infection threads. J. Bacteriol. 168: 1392-1401 pp.
- 48.- Paredes, O. 1986. La biotecnología de plantas. CONACYT Ciencia y Desarrollo. 68 : 26-43 pp.
- 49.- Puhler, A., E. Enenkel, A. Hillemann, et al., 1988. - Rhizobium meliloti and Rhizobium leguminosarum mutants defective in surface polysaccharide synthesis and root nodule development, In H. Bothe, F.J. de Bruijn, & W.E. Newton (ed.) Nitrogen fixation hundred years after. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 423-430 pp.
- 50.- Rodmond, J.W., Batley, M., Inner, R.W., et al., 1986. Flavones induced expression of the nodulation genes in Rhizobium. In: Recognition in microbe-plant symbiotic - and pathogenic interactions. Lugtenberg P. Springer. - Berlin. 115-122 pp.
- 51.- Rosenberg, C., Boystrad, P. Denaire, J., Casse-Delbert F. L., 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 184: 326-333 pp.
- 52.- Shearman, C. A., Roseen, L., Jonston, A.W.B. & Downie, J.A., 1986. The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nodI encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate. EMBO J.