

Tesis Doctoral 2006



CREER...CREAR...CRECER

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y
Naturales departamento de Ciencias Naturales



MORGANTE, C.A.
Mejoramiento de la F

2006

62166



“Mejoramiento de la Fijación Biológica de Nitrogeno
en Maní en suelos de la provincia de Córdoba.
Estudios sobre la interacción, maní - rizobio”



Carolina Andrea Morgante

T. 428



El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas fue realizado en la Orientación Biología General del Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto bajo la dirección de la Dra. Adriana Fabra.

Aprobado por el Tribunal de Tesis:

Dra. Virginia Luna

Dra. Liliana Odierno

Dr. Pedro Balatti

27 de Abril de 2006

62166

MFN:
Clasif:

A la memoria de mamá...

A mis dos amores Hernán y Agustina

Mi reconocimiento:

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, donde adquirí mi formación de grado y posgrado, por brindarme el espacio físico y el equipamiento necesario para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por el otorgamiento de 5 años de beca para mi dedicación a la investigación.

Mi agradecimiento:

A la Dra. Adriana Fabra, por confiar en mí, por estimular mi crecimiento científico y enseñarme a construir un pensamiento crítico. Por su admirable capacidad y su constante dedición a la ciencia y a la docencia. Por escucharme en innumerables momentos y por todo el cariño recibido.

A los miembros del jurado de tesis Dr. Pedro Balatti, Dra. Virginia Luna y Dra. Liliana Odierno por las valiosas sugerencias realizadas durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Stella Castro por tanta energía y alegría que emana hacia todos. Por su buena disposición y apoyo constante.

A Tania y Jorge por la inmensa ayuda recibida cada vez que los necesité, por los lindos e inolvidables momentos que pasamos juntos en estos 5 años y sobre todo... por tener "siempre" la mejor predisposición para escucharme. LOS QUIERO MUCHO!

A mis nuevos compañeros del Lab 21 y a los que ya no están en el lab: Vani, Fernando, Laurita, Eliana, Lucio y Mica con los que compartí largas y divertidas horas de laboratorio ... Gracias por ser tan buenos compañeros!

A los chicos del Lab. 22: Sonia, Caro, Analia, Flori y Edgardo por su buena onda, por festejar siempre mis locuras, por tantas charlas compartidas y fundamentalmente por su ayuda desinteresada.

A Hernán mi gran amor y amigo incondicional. Gracias por tu inagotable paciencia y comprensión constante, por ser el "motorcito de energía" que me da fuerzas para salir adelante en los momentos difíciles... y por hacer que cada día juntos sea mágico y especial.

A mi hija Agostina, por ser un "montón de ternura y amor" que alegra e ilumina mi vida cada día. Todo lo mejor para vos!

sigue en consulta

FORMULARIO DE PEDIDO MATERIAL BIBLIOGRÁFICO - SALA 20

AUTOR: Florian te Carolina
TÍTULO: Mejoramiento de la FBN en maní en suelos de R.P. 62
UBICACIÓN: T 428

CATEGORÍA: DOCENTE: GRADUADO: ALUMNO: OTRO:

FECHA SOLICITADA: 17/12/08

MAÑANA:

TURNO:

TARDE:

NOMBRE SOLICITANTE: Drejo Perry DNI: 28.173.630

FIRMA: 

EN CONSULTA: SI

EN FOTOCOPIADORA:

FIRMA: 

FIRMA: _____

DEVUELTO:

FECHA: / /

A mi familia: papi, Vero y Mauri por su gran amor, su constante apoyo, y fundamentalmente por estar siempre, más allá de la distancia.

A Ronal, Mirta y Andrea por tanta ayuda recibida, por hacerme sentir tan querida desde el primer día y ... por tantas siestas interrumpidas cuidando a "la gordita".

A Pao y Heraldo por su infinita y tan valiosa amistad, por poder contar con Uds. SIEMPRE! y fundamentalmente... por darme alojamiento y comida (ja!) mientras Agos estaba en mi panza.

A Nati y Juli por sus divertidas ocurrencias y por su amistad verdadera.

A las Dras. María del Carmen Tordable y Herminda Reynoso por sus valiosos aportes y sobre todo por dedicarme tanto tiempo en los experimentos de Microscopía.

Al Ing. Agr. Alejandro Peticari, por su buena disposición y su colaboración en los ensayos a campo.


A mis amigos de la facultad Fer C., Pao T., Lau M., Ale y Mari, por todo el cariño y la buena onda recibida, por los mails tan esperados y por la linda amistad que nos une... hoy y siempre.

A Juli M. y Marina F. por los ricos mates compartidos en mis "recreos de 10 minutos" y por tanto cariño brindado.

A la Dra. Ángeles Zorreguieta con quien adquirí valiosos conocimientos durante la realización de los experimentos de mutagénesis dirigida.

A Freddy por los lindos momentos compartidos y por los ricos vinos que trae cada vez que nos visita!

A toda esa gente linda con la que de una u otra forma compartí diferentes momentos de mi vida... Cómo olvidarlo!



“Ser uno mismo no consiste en seguir siendo lo que se era ni estar satisfecho con lo que se es, sino constituye un punto de partida...”

RESUMEN

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de inducir nódulos fijadores de N en raíces y tallos de leguminosas. Numerosos trabajos han demostrado que las especies rizobianas difieren en su competitividad para la nodulación, que es estimada por el porcentaje de nódulos formados cuando la leguminosa huésped es inoculada con una mezcla de diferentes especies o bien, cuando una cepa es aplicada como inoculante en suelos conteniendo poblaciones rizobianas indígenas. El objetivo del presente trabajo fue *seleccionar cepas nativas provenientes de suelos del área manisera de Córdoba, eficientes en la FBN en maní y tolerantes a condiciones ambientales adversas, para la utilización como inoculantes*. Los estudios realizados revelaron que el asilamiento nativo nodulante de maní NCHA22 (Sm^R) formó la mayor proporción de nódulos (69%) cuando fue coinoculado con la cepa comercial *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144. Además se analizó el comportamiento simbiótico de NCHA22 en ensayos en microcosmo y en condiciones a campo.

La nodulación eficiente se encuentra controlada entre otros factores, por la composición y fisiología de la superficie celular. Se ha demostrado que mutantes defectivas en la biosíntesis de exopolisacáridos (EPSs) son incapaces de establecer simbiosis con leguminosas que son infectadas por mecanismos que involucran la formación de hilos de infección. El maní (*Arachis hypogaea* L.) difiere de otras leguminosas en que la penetración de los rizobios en células epidérmicas y de la corteza radical así como la invasión del primordio del nódulo ocurre sin la formación de hilos de infección e involucra, en cambio, una penetración intercelular (crack entry). Con el objetivo de determinar el rol simbiótico de los EPSs rizobianos en este particular mecanismo de infección que ocurre en maní, se obtuvo por mutagénesis transposicional la mutante M1024, a partir de un rizobio nativo nodulante de maní. Los análisis realizados en dicha mutante revelaron una reducción del 27% y 54% en el contenido de EPSs cuando se adicionó manitol o glucosa como fuentes de carbono, respectivamente. El estudio de la composición de azúcares mediante GLC reveló una disminución del 54% en los residuos de galactosa. No se observaron cambios en la composición de otros polisacáridos de superficie como LPSs y β -glucanos cíclicos. Por otra parte, las cepas silvestre y mutante presentaron un comportamiento comparable en medio mínimo Manitol, por lo que la inserción del mTn5SSce/B31 no afectó el metabolismo general de la bacteria. El comportamiento simbiótico de la mutante se evaluó en plantas de maní inoculadas con 1×10^8 bacterias g^{-1} suelo luego de 8 semanas de incubación. Se observó un menor número de plantas noduladas con una reducción significativa en el número de nódulos totales (23%), peso seco aéreo (27%) y contenido de N (23%) de plantas inoculadas con la mutante M1024. Mediante microscopio electrónico de transmisión se observaron severas alteraciones en el desarrollo de los nódulos. Los escasos bacteroides encontrados indicarían que la mutante M1024 induce nódulos vacíos no fijadores de N en esta leguminosa. Se realizaron estudios de supervivencia de la mutante a los 2, 25 y 50 días post inoculación. El inóculo su viabilidad durante todo el experimento, con más de 1×10^6 bacterias g^{-1} de vermiculita, tanto en el soporte inerte no asociado a raíces como en la rizósfera. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan evidencias de que los EPSs rizobianos juegan un rol importante en la infección que ocurre en maní, la cual no involucra la formación de hilos de infección. Por otra parte, debido a que la incorporación de H₂O₂ al interior de M1024 se encuentra incrementada, se postula que los EPSs serían requeridos para la protección de los rizobios frente a los mecanismos de defensa desencadenados por las plantas.

ABSTRACT

Rhizobia are soil bacteria that are able to induce nitrogen-fixing nodules on the roots or stem of legume plants. There have been extensive data showing that rhizobial strains differ in their nodulating competitiveness as estimated by the percentages of nodules formed when the host legumes are inoculated with a mixture of strains or when they are applied as a single inoculant in soil containing indigenous rhizobial population. In this work it was selected a native peanut nodulating rhizobia, highly efficient and stress tolerant, for use as inoculant in this crop. Results obtained revealed that the peanut nodulating isolate NCHA22 (Sm^R) formed a high proportion (69%) of nodules when it was inoculated with the commercial strain *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. The symbiotic behaviour of NCHA22 was analyzed in a microcosm as well as in a field experiments.

Efficient nodulation is controlled among other factors by rhizobial cell surface composition. It has been demonstrated that mutants defective in exopolysaccharides (EPSs) biosynthesis are not able to establish symbiosis in legumes infected by the infection thread mechanisms. *Arachis hypogaea* L (peanut) differs from other legumes in that rhizobia penetration into the roots and in the cortex, and spreading inside the nodule occur without cell infection threads formation and involves intercellular penetration (crack entry). In order to determine the symbiotic significance of rhizobia EPSs in the particular infection mechanism developed in peanut, we obtained a Tn5 generated mutant, designed as M1024, from a native peanut symbiont isolate. Quantitative analysis revealed a reduction of 27% and 54% in the EPSs production when the mutant was growing with mannitol and glucose as carbon sources, respectively. In addition to the reduced amount of total EPSs, a significative reduction (64%) in the EPSs D-galactose content was also observed by GLC analysis. Measurements of LPSs and β -glucans content failed to show any differences between this mutant and the wild type strain. Furthermore, the unaffected growth ability of M1024 compared with the wild type strain in minimal medium indicated no alteration in the housekeeping genes. Symbiotic performance of this EPSs altered mutant was investigated in inoculated peanut plants (1×10^8 bacteria per g of vermiculite) after 8 weeks of incubation. A lower number of nodulated plants and a significant reduction in the nodule number (23%), shoot dry weight (27%) and nitrogen content (23%) were observed in plants when mutant was inoculated. A severe alteration in the nodule development was also detected by transmission electron microscopic observation. Very few bacteroids were observed, indicating that the mutant altered in the EPS production, induces empty non-nitrogen-fixing nodules in this legume. Soil persistence of inoculated mutant was assayed after 2, 25 and 50 days postinoculation. It was found that the inocula persisted throughout the experiment in rhizosphere and bulk soil, with more than 1×10^6 bacteria per g of vermiculite. This study provides evidences that EPSs may play an important role for symbiosis development in peanut, a legume that is infected without infection thread formation. Since the incorporation of H₂O₂ inside M1024 is incremented, it was also proposed that EPSs could play an important role in protecting the microsymbiont against plant defence reactions.

Parte de este trabajo de tesis ha sido publicado en la siguiente revista internacional:

"Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut".
Morgante, C., Angelini, J., Castro, S., and Fabra, A. Soil Biol. Biochem. (2005) 37: 1436-1444.

Además se han realizado numerosas presentaciones en congresos nacionales e internacionales.



ELSEVIER

Soil Biology & Biochemistry 37 (2005) 1436–1444

Soil Biology &
Biochemistry

www.elsevier.com/locate/soilbio

Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut[☆]

Carolina Morgante, Jorge Angelini, Stella Castro, Adriana Fabra*

Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Enlace Rutas 8 y 36 Km, 603-5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Received 20 August 2004; received in revised form 21 December 2004; accepted 28 December 2004

Abstract

The early stages of the symbiosis in legumes, when rhizobia enter the plant root, penetrate into the root cortex and spread inside nodules, vary among legume species. The most studied infection mechanism involves infection thread formation while the most simple occur by crack entry/intercellular spreading mode as in *Arachis hypogaea* L. (peanut). Using a peanut nodulating rhizobia strain impaired in the exopolysaccharide production we have examined the nature of its symbiotic deficiency. Our observations indicate that the inoculation of *Arachis hypogaea* L. with this exopolysaccharide deficient mutant results in the formation of nodule-like structures and very few nitrogen-fixing nodules. These data contribute to our understanding of exopolysaccharides role in the plant–rhizobia interactions leading to the formation of determinate nodules, particularly relevant for legumes that are infected without infection thread formation.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Inf⁻ phenotype; Impaired nodulation; Nitrogen-fixing activity

1. Introduction

Rhizobia are able to attach to legumes roots, enter this organ in different ways (from the most studied infection threads to the most simple crack infection process) and induce root cortical cells division, leading to the nodules formation. The establishment of this symbiosis is based on the molecular interaction of two partners, including host plant flavonoids and bacterial Nod factors. Rhizobial cell-surface carbohydrates, such as lipopolysaccharides (LPS), capsular polysaccharides (CPS), exopolysaccharides (EPS) and cyclic β -glucans may also have important functions in the symbiosis and in the free-living forms of these bacteria (Frayse et al., 2003).

A number of groups have shown that nodule invasion or development induced by rhizobial symbionts of various plant hosts such as alfalfa, pea, clover and *Leucaena* require

bacterial EPS (Leigh and Walker, 1994; Borthakur et al., 1986; Becker and Pühler, 1998; Pellock et al., 2000; Mazur et al., 2002). EPS perception in the two basic nodule ontogenies, determinate (round) and indeterminate (continually elongating), appears to be different. Thus, rhizobial EPS seems to be essential for the establishment of nitrogen-fixing symbiosis only on legumes developing an indeterminate type of nodule. For example, inoculation of alfalfa, which produces indeterminate nodules, with EPS mutant symbionts results in nodule-like organs with the central tissue not invaded by the bacteria (Inf⁻ phenotype). For *R. leguminosarum* bv *viciae* and bv *trifolii* it was informed that *exo* mutants are affected in their ability to induce infection threads or in the bacteroid release and development (van Workum et al., 1998; Rolfe et al., 1996). To the contrary, inoculation of plants that produce determinate nodules with EPS mutants leads to effective nitrogen-fixing symbiosis (Leigh and Coplin, 1992). However, Kosch et al. (1994), showed that inoculation of various host plants forming determinate nodules (*Glycine max*, *Glycine soja*, *Macroptilium atropurpureum*, *Vigna radiata*) with the EPS mutant *Bradyrhizobium japonicum* Δ P22 yields an Inf⁻

[☆] NET 30 16S rRNA gene nucleotide sequence data is at the GenBank data base as accession number AY427206.

* Corresponding author. Tel.: +54 358 4676 114; fax: +54 358 4676 230.

E-mail address: afabra@exa.unrc.edu.ar (A. Fabra).

phenotype and impairments whose extent are dependent on the host plant genotype. Furthermore, Parniske et al. (1994) reported that an EPS-defective mutant of *Bradyrhizobium japonicum* which forms nitrogen-fixing nodules on *G. max* was ineffective on *G. soja*, and Parveen et al. (1997) showed that an EPS-defective mutant of *Rhizobium* sp. strain TAL1145 still nodulates various hosts, independently of their nodule type. An *Azorhizobium caulinodans* mutant impaired in the EPS production formed infection threads in *Sesbania rostrata* but was affected in the internalization into plant cells (D'Haeze et al., 2004).

Stacey et al. (1991) explained the proposed alternative roles of EPS in the development of determinate or indeterminate nodules by pointing out the morphological differences in infection threads. This is, root hair infections leading to determinate nodules occur by narrow infection threads as opposed to broad infection threads that lead to the formation of indeterminate nodules. Then, EPS could be a critical matrix component of the threads and influence the infection thread penetration. Alternatively, Leigh and Coplin (1992) proposed that these polysaccharides may act as suppressors of plant-defense systems, which would otherwise inhibit the rhizobia from infecting the plant.

It is generally assumed that the nodule morphogenesis, the mode of infection and the uptake of rhizobia in nodule cells are under the control of the host plant. In *Arachis hypogaea* L. (peanut) the rhizobial infection mechanism differs from other herbaceous legumes. Rhizobia penetration into the root and in the cortex as well as spreading inside the nodules occur without cell infection threads formation and involves intercellular penetration (crack entry). *Arachis hypogaea* rhizobia induce deformation of hairs located only at the sites of emerging lateral roots. However, the actual infection site is at the junction of a hair cell with epidermal and cortical cells. Rhizobia appear to enter the cortical cells through the structurally altered cell walls. Within cortical cells, rhizobia multiply rapidly and the invaded cells divide repeatedly to form a determinate nodule (Boogerd and van Rossum, 1997). Thus, several of the phenomena that are essential in the infection thread mode do not occur in the crack entry infection process. Understanding the latter infection mechanism is relevant to develop strategies to extend nodulation to agronomically important plants since this process shares common features with the infection of some nitrogen-fixing non-legumes (Sprent and de Faria, 1988; Boogerd and van Rossum, 1997).

The aim of this study is to characterize the role that rhizobial EPS play in the crack entry infection mechanism developed in peanut. Considering that rhizobial polysaccharides in plant–microbe interactions are of continued interest because the exact mechanism of symbiotic developing are still unclear (Frayse et al., 2003) and that *Arachis hypogaea* L. is an useful tool to analyze the explanation done by Stacey et al. (1991) for the different roles of EPS in the development of determinate and indeterminate nodules, the symbiotic behavior of a peanut nodulating EPS mutant strain was here analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids and bacterial strains

Table 1 lists the plasmid and bacterial strains used in this study. Rhizobial bacterial strain NET30 was isolated from nodules of *Arachis hypogaea* L. in an uninoculated soil from Córdoba, Argentina. It was confirmed as positive for nodulation in this legume host and phenotypically and genotypically characterized (Taurian et al., 2002a,b). Comparison of the complete 16S rDNA sequences showed that NET30 had identity levels of 99% with *R. giardinii* by *giardinii* H152 and 98% with *Sinorhizobium* sp. 9702-04. NET30-M1024 is a mutant obtained from NET30, altered in the EPS production. Unless otherwise noted, rhizobia were cultured in YEMA (Vincent, 1970) or MM (Robertsen et al., 1981) media. *E. coli* strain was cultivated on LB (Saambrok et al., 1989) or TY (Beringer, 1974) media. The antibiotic spectinomycin ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$) was included as required.

2.2. Transposon mutagenesis and identification of mutant M1024

Transposon mutagenesis of strain NET30 with mTn5SsclB31 in the pAS131 (kindly provided by Dr A. Sessitsch) was performed as described by Simon et al. (1983). This transposon is under the control of the *Bradyrhizobium (parasponia)* sp. *nifH* promoter, which is active in nitrogen-fixing legume nodules. Transconjugates (spectinomycin resistant clones) were spread onto MM agar supplemented with spectinomycin ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$). Approximately 2500 Tn5 mutants of NET30 were obtained and they were purified by streaking twice in MM plates. Mutants altered in EPS production were isolated on the basis of

Table 1
Bacterial strains and plasmid used in this study

Designation	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294, carrying a modified RP4(Ap ^S Tc ^S Km ^S) within the chromosome	Simon et al. (1983)
NET30-wt	Fast grower native isolate from Eturia, Córdoba Province, Argentina	Taurian et al. (2002a,b)
NET30-M1024	EPS impaired mutant obtained from NET30 isolate	This work
pAS131	pUT/mini-Tn5 containing the mTn5SsclB31 element	Sessitsch et al. (1998)

changes in their mucoid phenotypes when grown on 20E medium (Werner et al., 1975) plates. Defects in EPS biosynthesis were confirmed following the Sudan Black B screening procedure (Liu et al., 1998). This method is based on the differential dye uptake by exopolysaccharide-producing and mutant strains. Each Tn5 generated mutant with altered mucoid phenotype was simultaneously spread as single colony onto MM1 (Peoples and Sinskey, 1989) and Harada (Amemura et al., 1974) agar plates. Plates were incubated at 30 °C for 24 h and colonies were stained with Sudan Black B. A single black stained colony was detected and is referred as NET30-M1024 in this manuscript. PCR amplification of IS50 with specific primers S1 (5'-GCTCGATCTAGAACGTTTCATGATAACTTCTGC-3') and S2 (5'-TCTGCGGACTGGCTTTCTAC-3') further confirmed the presence of the transposon in the NET30-M1024 mutant.

2.3. DNA preparation

Colonies grown on YEMA plates were suspended in 300 µl NaCl 1 M (picked up by using a 1 µl plastic disposable loop), mixed and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 300 µl bidistilled sterile water. After centrifugation at 13,000 rpm for 5 min, the pellet was suspended in 150 µl of 6% (aqueous suspension) resin Chelex 100® (Bio Rad®). This suspension was incubated at 56 °C for 20 min, followed by mixing and incubation at 99 °C for 8 min.

2.4. REP-PCR

NET30-M1024 was genotyped by a DNA fingerprinting method based on repetitive extragenic palindromic sequence-PCR (REP-PCR) (de Bruijn, 1992) using REP-1 (5'-IIICGICGICATCIGGC3') and REP-2 (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC3') primers, to verify that it originated from the strain NET30-wt. PCR was performed in a Biometra UNO-thermoblock, Göttingen, Germany. The 15 µl reaction mixture contained 1 × PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM each nucleotide (Promega), 0.31 µM of each primer, 0.55 U of *Taq* DNA polymerase (Promega) and 3.2 µl of template DNA solution. The temperature profile was as follows: initial denaturation at 95 °C for 1 min; 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 40 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min; and final extension at 65 °C for 16 min.

2.5. Isolation and analysis of exopolysaccharides

EPS were obtained from 20 ml NET30-wt and NET30-M1024 cultures growing in 125 ml flasks containing MM1 (fructose 1 g l⁻¹), Harada (glucose 2.5 g l⁻¹), or YEM (mannitol, 10 g l⁻¹) broth media for 24 h, following the method described by Skorupska et al. (1985). Quantitation

of total carbohydrates content was done by the anthrone assay (Dische, 1962).

To characterize the EPS sugar composition, NET30-wt and NET30-M1024 strains were grown on MM broth medium until early stationary phase of growth. Five milligrams of EPS obtained as described above were hydrolyzed in 2 N HCl at 100 °C for 3 h in sealed tubes. The hydrolyzed EPS were nitrogen-dried and resuspended in a small volume of bidistilled water for analysis by gas liquid chromatography (GC).

2.6. Measurement of LPS and β-glucans production

Five millilitres of early stationary NET30-wt or NET30-M1024 cells grown in MM broth medium were harvested by centrifugation at 3500 rpm for 10 min. Glucans were extracted from the cell pellets with 200 µl of 75% ethanol for 30 min and separated by TLC plates with ethanol/butanol/water (5:5:4) as described by Breedveld and Miller (1994). LPS were extracted with 0.5 ml lysis buffer containing 2% SDS, 5% dithiothreitol, 10% glycerol and 0.02% bromophenol blue, and boiled for 10 min. Aliquots of each extract were treated with 2.5 mg ml⁻¹ proteinase K (Hitchcock and Brown, 1983). SDS-PAGE was carried out on 17% polyacrilamide gels as described by Laemmli (1970). Gels were silver stained as described by Tsai and Frasch (1982).

2.7. Microcosm studies

After germination, peanut seedlings (cv Tegua) were aseptically transferred to pots containing sterile vermiculite (one seedling per pot) and grow as previously described (Taurian et al., 2002a). To prepare the inoculum, NET30-wt and NET30-M1024 strains were grown to early stationary phase in YEM (mannitol) medium (80 µg ml⁻¹ spectinomycin when required). Three millilitres of aliquots were centrifuged for 10 min at 10,000g, resuspended in 3 ml fresh medium (approximately 10⁸ ufc ml⁻¹) and added to each 7 d peanut seedling. Control uninoculated plants were also included. At 60 d post-inoculation, percentage of nodulated plants, number and dry weight of nodules formed, dry weight and nitrogen content of plant shoot were determined.

2.8. Persistence assay

The persistence of inoculated mutant strain was assayed at 2, 25 and 50 d after inoculation in accordance to Van Dillewijn et al. (2001). This was tested on two different surfaces: rhizosphere (vermiculite adhering to the root surfaces) and bulk surface (not associated with peanut roots). One gram of samples from bulk vermiculite were resuspended in 1 ml sterile PBS and shaken at 150 rpm for 15 min to detach the bacteria. Dilutions (1:10 in sterile PBS) of the bacterial suspension were plated onto MM plates (80 µg ml⁻¹ spectinomycin, when appropriate).

Samples from rhizosphere were obtained by washing peanut roots with 20 ml sterile PBS for 20 min at 150 rpm. The washes were centrifuged for 5 min at 10,000 rpm at 4 °C. One gram of the pellet was used to produce serial 1:10 dilutions in sterile PBS, which were then plated onto MM plates with or without the addition of spectinomycin. Plates were incubated at 30 °C and the number of colony forming units was determined.

2.9. Nodule occupancy assay.

Three millilitres of inocula (10^5 cfu ml⁻¹) from NET30-wt and NET30-M1024 YEM cultures were applied to one 7 d plant growing as described above. Plants were harvested at 60 d post-inoculation. Roots from four plants were pooled, washed and incubated at 70 °C for 60 min to eliminate endogenous β -galactosidase activity. Nodule occupancy was determined after roots were histochemically stained to specifically reveal the bacterial β -galactosidase (E.C. 3.2.1.46) activity associated with the pAS131 expression as described by Arsène et al. (1994). Nodule occupancy was assessed by counting blue and white nodules.

2.10. Electron microscopy

Nodules obtained 60 d after seedling inoculation with bacterial cultures in Harada medium, were fixed in Sorensen phosphate buffer (pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde for electron microscopy studies. After 3 h, the nodules were rinsed in the same buffer and post fixed for 3 h in 100 mM Sorensen phosphate buffer (pH 7.2) containing 2% osmium tetroxide at 4 °C. Samples were stepwise dehydrated by passing through a graded series of acetone (25, 50, 75% and three time in 100%) and embedded in Spurr low-viscosity embedding medium. Polymerization was performed overnight at 70 °C. Samples ultra thin sections (80 nm thick) were double stained, first with an aqueous solution of uranyl acetate (15 min) and then by the Reynolds (1963) method (1 min). Observations were performed with a transmission electron microscope (JEOL 100 CXII) operating at 80 kV.

2.11. Protein determination

It was performed in accordance to Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.

2.12. Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate and the Student *t*-test (at the 0.05 significance level) was used to calculate statistical differences.

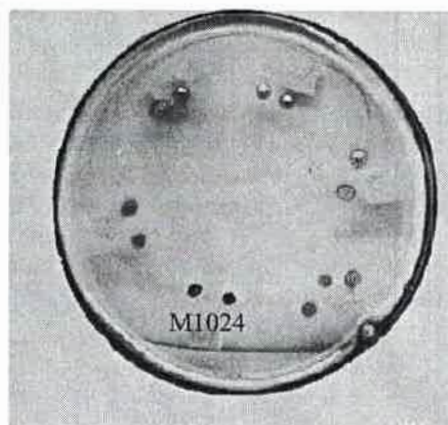


Fig. 1. Wild-type strain and transconjugate grown on MM1 plates and stained with Sudan Black B.

3. Results

3.1. Biochemical characterization of mutant NET30-M1024

NET30-M1024 was identified as forming non-mucoid colony on 20E medium, where NET30-wt (wild-type) is mucoid. This strain also gave a black color in the Sudan Black B assay, both using MM1 (fructose) or Harada (glucose) medium (Fig. 1). It was purified by single-colony isolation. The identical profiles obtained by REP-PCR of mutant and parent strains confirmed that NET30-M1024 is derived from NET30-wt isolate (Fig. 2). The presence of transposon in the genome of the mutant was also verified by amplification of IS50 element of mTn5SS*ce*/B31 (data not shown). The LPSs and β -glucans composition from



Fig. 2. REP fingerprints of NET30-wt strain (lines 1 and 2) and NET30-M1024 mutant (lines 3 and 4). Line 5: negative control (not template used in the reaction).

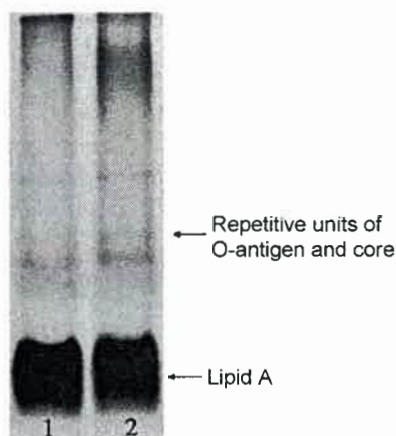


Fig. 3. SDS-PAGE of LPS from NET30-wt strain (1) and from NET30-M1024 mutant (2).

the parent and mutant strains was determined qualitatively. Results obtained indicated that the production of these molecules was not affected by the insertion of Tn5 (Figs. 3 and 4). The growth of the NET30-M1024 mutant in MM media (mannitol 10 g l^{-1} or galactose 10 g l^{-1}) was comparable to its parent NET30-wt, indicating no apparent ill effect of the insertion of Tn5 in its genome (Fig. 5).

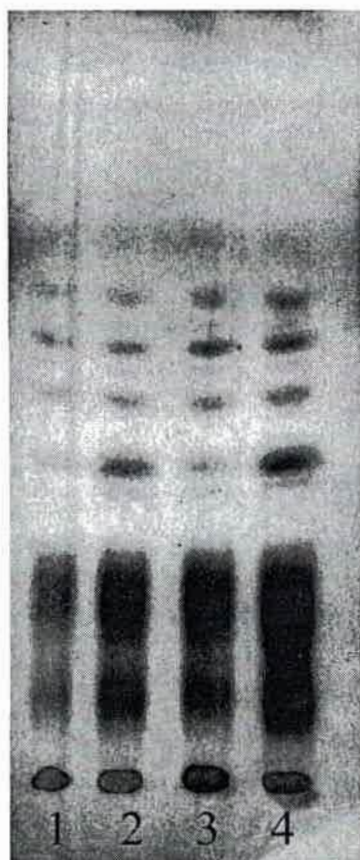


Fig. 4. TLC analysis of β -glucans from ethanolic cell extracts of NET30-wt strain (lines 1 and 3) and of NET30-M1024 mutant (lines 2 and 4). Lines 1 and 2, $10 \mu\text{l}$; lines 3 and 4, $20 \mu\text{l}$.

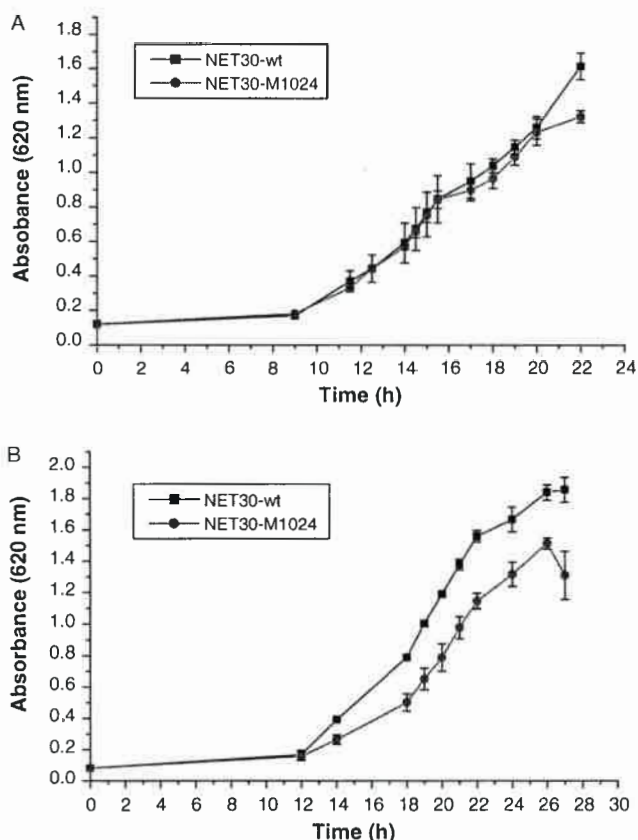


Fig. 5. Growth rate of NET30-wt and NET30-M1024 EPS impaired mutant in (A) MM (mannitol) and (B) MM (galactose).

Unfortunately, cloning of genomic fragment to identify the mutated gene was unsuccessful, probably because of the very large size of restriction fragments.

3.2. Mutant NET30-M1024 exopolysaccharide production

Although both, NET30-wt strain and mutant NET30-M1024 produced EPS with either carbon source, production on mannitol and fructose was higher than that on glucose (Table 2). NET30-M1024 showed a non-mucoid phenotype on agar plates. This qualitative observation was therefore pursued determining the amount of EPS obtained from the mutant and parent strain at stationary phase of growth when different carbon sources were present in minimal culture media. The mutant had markedly reduced EPS content in all the growth media tested. The amount of EPS produced by cells growing with glucose, fructose or mannitol as carbon sources fell to 47, 57 and 73%, respectively, of the wild-type strain EPS production.

The nature of the carbohydrates in EPS from mutant and parent strains grown in MM medium (mannitol) was identified by gas liquid chromatography. Peaks characteristic of D-glucose, D-galactose and D-arabinose were evident in both strains, being D-glucose the major sugar residue (Table 3). However, in addition to the reduced amount

Table 2
Exopolysaccharide production by NET30-wt and NET30-M1024 on different carbon sources

Bacteria	YEM medium (mannitol 10 g l ⁻¹) (mg hexose/mg protein) ^a	MM1 medium (fructose 1 g l ⁻¹) (mg hexose/mg protein) ^a	Harada medium (glucose 2.5 g l ⁻¹) (mg hexose/mg protein) ^a
NET30-wt	1.11 ± 0.16	1.18 ± 0.23	0.56 ± 0.24
NET30-M1024	0.81 ± 0.23*	0.67 ± 0.18*	0.26 ± 0.04**

*Significantly different from NET30-wt (*t*-test, *P* < 0.05).

^a Values are means ± SE of three independent experiments.

of total EPS, a significant reduction (54%) in the EPS D-galactose content was observed in NET30-M1024.

3.3. Peanut nodules infected by NET30-M1024 mutant differ structurally and physiologically from wild-type infected nodules

A lower number of nodulated plants were observed when mutant was inoculated. The peanut root nodules induced by mutant NET30-M1024 were paler than wild-type nodules, but no differences in the mass of the nodules were detected (Table 4). The presence of Tn5 in bacteria isolated from the nodules obtained at 60 d post-inoculation was confirmed by IS50-PCR. In plants infected with the wild-type strain, the mean nodule number per plant was about 1.9 times greater than for plants infected with NET30-M1024. Dry weight and nitrogen content of peanut shoot differed markedly between plants inoculated with mutant and the wild-type strains, also indicating a disturbed nodulation process following the inoculation with NET30-M1024.

Survival of the NET30-M1024 strain both in rhizosphere and bulk surface was not affected until 25 d after inoculation since no variation in the number of colony forming units was observed between mutant and parent strain (Table 5). However, at 50 d after inoculation a slight reduction in the number of viable mutant cells was observed.

The influence of EPS production on nodule occupancy was assayed in peanut seedlings co-inoculated with NET30-M1024 and NET30-wt strains. Plants were harvested after 60 d, and the roots were stained to determine β-galactosidase activity. Only the 2% of the nodules was blue (Fig. 6). As the *celB* gene is under the control of the *nifH* promoter (which is active in nitrogen-fixing nodules), it can be assumed that the blue nodules observed are occupied by the NET30-M1024 mutant and are nitrogen-fixing.

Fig. 7 illustrates the ultrastructure of nodules at 60 d after inoculation with a culture of NET30-M1024 in Harada medium (where the EPS production of the mutant is reduced by the 50%). In nodule cells infected by wild-type strain several bacteroids were enclosed within of the symbiosome membranes, and many bacteroids had electron-translucent deposits of poly-β-hydroxybutyrate. In contrast, in nodules induced by mutant NET30-M1024 only a few bacteroids and abundant empty cells containing large vacuoles were observed.

4. Discussion

Rhizobial plant symbionts produce EPS that often play an essential role in the plant–bacteria interaction. Several evidences indicate that these molecules are required for nodule development in legumes that form indeterminate nodules, but not in those that form determinate nodules. The relationship between nodules type and EPS role was underscored by instances in which the same rhizobial strain is able to nodulate plants of both types of nodules. Thus, Diebold and Noel (1989) showed that EPS-deficient *R. leguminosarum* mutant affected the nodule development on clover and pea but not on bean. The different EPS requirements for the two nodule-type legumes are not clear. In addition to the Stacey et al. (1991) proposition, Leigh and Coplin (1992) give another explanation to this fact. They proposed that the difference in the EPS requirement might reflect the function of EPS in infection thread penetration since in indeterminate nodules bacteria spread into new cells by continued infection thread penetration, while in determinate nodules spread primarily by the division of cells already containing bacteria. However, results obtained by Cermola et al. (2000) suggested that infection threads appear to be the mechanism for cell-to-cell spread of the rhizobia in *Phaseolus vulgaris* determinate nodules, as occurs in indeterminate-type nodules. Another symbiotic role proposed for rhizobial EPS is that these molecules could also function non-specifically in avoiding a plant-defense response.

Legume genotype determines the rhizobial mode of invasion and nodule morphogenesis. Although a mixed type of rhizobial invasion (infection threads and intercellular penetration) has been shown to occur in several tropical legumes, *Arachis hypogaea* L. (and also *Stylosanthes*) never shows structures resembling infection threads in either root hairs or developing nodules (Boogerd and van Rossum, 1997). Instead, rhizobia spread entirely intercellularly in peanut by separating cortical cells at the middle lamellae.

Table 3
Carbohydrate composition analysis of exopolysaccharide production by NET 30-wt and NET30-M1024

Bacteria	Relative percentage		
	Arabinose	Galactose	Glucose
NET 30-wt	18.2	18.5	63.3
NET30-M1024	17.6	8.4	74.0

Table 4
Symbiotic phenotypes of the NET30-wt and the NET30-M1024 strains

Bacteria	Symbiotic parameters				
	Nodulated plants (%)	No. of nodules per plant ^a	Nodule per plant dry wt (g) ^a	Shoot dry wt (g) ^a	Nitrogen content (mg/g d.w.) ^a
NET30-wt	100	26.58 ± 2.75	0.0402 ± 0.009	1.10 ± 0.09 ^b	34.57 ± 2.54 ^b
NET30-M1024	92	13.75 ± 3.50 ^c	0.0403 ± 0.011	0.80 ± 0.08 ^c	26.63 ± 3.38 ^{b,c}
Uninoculated	–	–	–	0.89 ± 0.09	19.95 ± 1.38

^a Data are the means ± SE of 16 independent determinations.

^b Significantly different from NET30-wt (*t*-test, *P* < 0.05).

^c Significantly different from uninoculated plant (*t*-test, *P* < 0.05).

Table 5
Survival of NET30-wt strain and NET30-M1024 EPS impaired mutant in rhizosphere and bulk surface

Bacteria	Rhizosphere Log (cfu g ⁻¹) ^a			Bulk surface Log (cfu g ⁻¹) ^a		
	2 dpi	25 dpi	50 dpi	2 dpi	25 dpi	50 dpi
NET 30-wt	ND	7.40 ± 0.02	8.84 ± 0.30	8.47 ± 0.17	7.92 ± 0.42	9.25 ± 0.30
NET30-M1024	ND	8.43 ± 0.40	7.90 ± 0.04*	8.74 ± 0.30	7.37 ± 0.43	7.22 ± 0.30*

*Significantly different from NET30-wt (*t*-test, *P* < 0.05). dpi, Days post-inoculation; ND, not determined.

^a Data are the means ± SE of three replicates for each treatment (*n* = 9).

Considering this, peanut appears as a useful model to better understand the role of EPS in the plant–rhizobia interaction.

Toward better understanding this process, we obtained an EPS-impaired mutant (NET30-M1024) from a native peanut symbiont strain. It was observed that the impairment in the EPS production by NET30-M1024 was both quantitative and qualitative. A diminished EPS content was determined when NET30-M1024 was grown in rich or minimal media, and also EPS D-galactose level was lower in the mutant compared to the wild-type strain. It is interesting to note that the EPS production by both wild-type and NET30-M1024 was lower when glucose was the carbon source, compared with fructose or mannitol media. For *Sinorhizobium meliloti* it has been proposed that, since these sugars enter the cells via similar high-affinity active-transport system, the difference observed in the EPS production could be explained by a low synthesis of glucose-6-phosphate (the EPS precursor). This would be associated with the extracellular conversion of glucose to gluconic or 2-ketogluconic acid, and its intracellular conversion into 6-phosphogluconate, whereas fructose enters cells directly and can yield glucose-6-phosphate (Tavernier et al., 1997).

Gas liquid chromatography analysis reveals that EPS from peanut symbiont grown with mannitol are constituted by D-glucose, D-galactose and D-arabinose residues, being D-glucose the most abundant sugar. The presence of D-arabinose in rhizobial EPS has also been reported for a *Sinorhizobium* isolate (Janecka et al., 2002).

The NET30-M1024 mutant, cultured in YEM medium where its EPS content was diminished by the 27%, exhibited abnormal symbiotic phenotype. Thus, a lower percentage of peanut plant was nodulated when inoculated with this mutant. Moreover, shoot dry weight and nitrogen content were diminished in relation with those plants inoculated with

the wild-type strain. The impaired symbiotic phenotype of NET30-M1024 with its legume host cannot be related with an altered survival ability of this mutant, since no difference was found between mutant and wild-type strain in the persistence assay at least until 25 d after inoculation. Provided that in this legume nodules are formed at 20 d, one may assume that the slight diminution in the NET30-M1024 cell viability determined at 50 d is not affecting peanut nodulation. However, it could be indicating that, aside from their role in the plant interaction, the bacterial EPS are relevant in other niches as well, such as in soil or rhizosphere where they may be influencing bacteria survival.

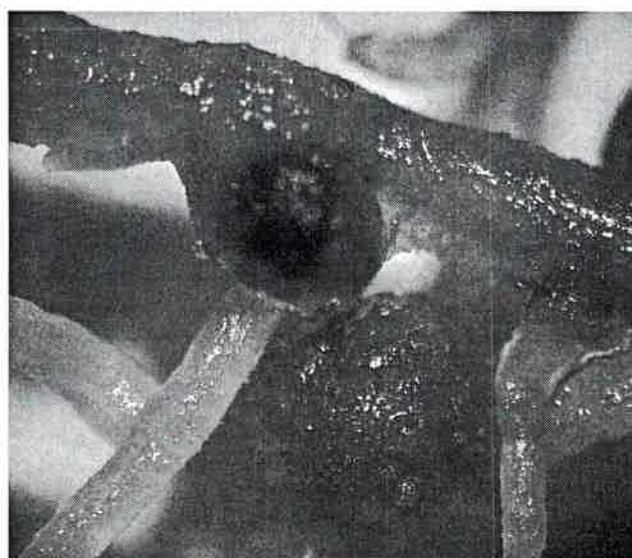


Fig. 6. Nodule occupancy by mutant. Blue nodules are occupied by NET30-M1024 with nitrogen-fixing activity.

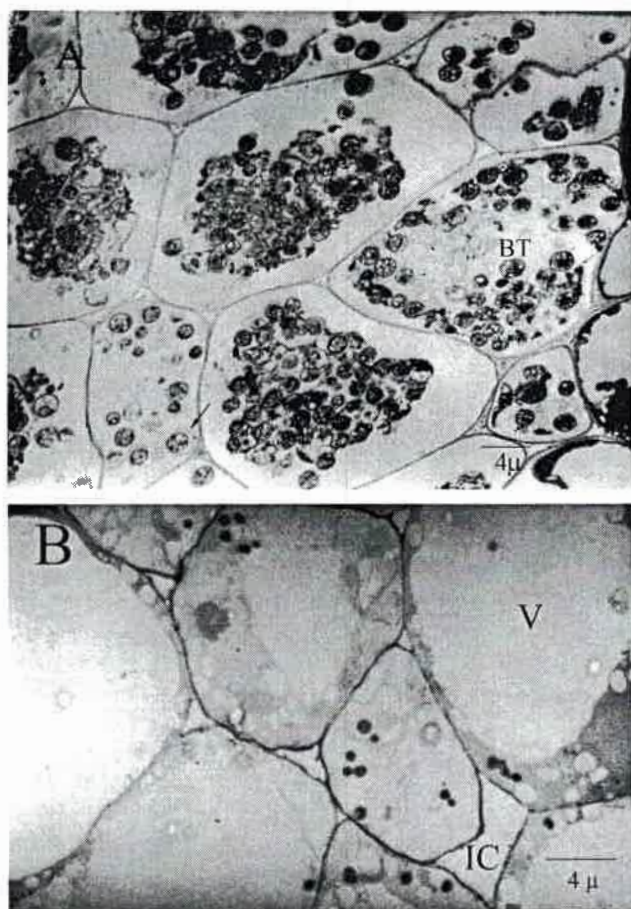


Fig. 7. Transmission electron micrographs of *Arachis hypogaea* L. nodules induced by NET 30-wt and NET30-M1024 strains. (A) NET30-wt; (B) NET30-M1024. Bacteroids (BT), symbiosome membranes (SM), vacuoles (V), intercellular space (IC) are indicated. Bars, 4 μ m.

The severe disturbance of nodule development in peanut roots inoculated with NET30-M1024 was also detected at the microscopic level. Electron-microscopic observation of peanut nodules infected with a culture of NET30-M1024 in Harada medium (where the EPS production of the mutant is reduced by the 50%) confirmed low nodule occupancy. Very few bacteroids were observed, suggesting that the Tn5 mutant impaired in the EPS production induces many empty non-nitrogen-fixing (Fix⁻) nodules on this legume.

The defect in nodule development reported for EPS mutants varies with the plant–rhizobia partners. Thus, for *S. meliloti* EPS mutants on alfalfa it was observed alterations in nodulation at several morphological levels, some of these as direct consequences of EPS deficiency while others perhaps represent later effects of an early alteration in the nodule formation pathway: root-hair curling is delayed; infection threads do not penetrate the nodule; aborted infection threads; nodules fully differentiated but lacking persistent meristem (Leigh and Coplin, 1992). To the contrary, it was observed no formation of visible nodules on peas infected with *R. leguminosarum* EPS mutant as well as no formation of undifferentiated calluses on *Leucaena*

when *Rhizobium* sp NGR234 EPS mutant was inoculated (Chen et al., 1985; Diebold and Noel, 1989).

The interaction between *B. japonicum* Δ P22 and *G. soja* PI468397 was the first example of an Inf⁻ phenotype of a plant with a determinate nodule type in combination with an EPS mutant, and underlined the importance of this surface polysaccharide in symbiosis with this host (Kosch et al., 1994). Our data support this report, as well as those from Parniske et al. (1994) and Parveen et al. (1997), providing evidences that EPS are involved in the interaction between peanut–rhizobia that lead to the formation of determinate nodules. Moreover, in this paper we show that EPS are also essential for symbiosis development in a legume that, in contrast to soybean, is infected without infection threads formation. Thus, the hypothesis that EPS is not playing a role for plants with determinate nodule type (Gray and Rolfe, 1990) has to be revised. The observation that a mutation affecting peanut rhizobia EPS production does not allow nodule invasion, leads to the question of what role EPS may play in this symbiotic interaction. In this context, and as infection threads are not formed in peanut, it is tempting to speculate that EPS are involved in the reduction of the plant-defense response. Supporting this hypothesis is the fact that, in contrast to rhizobia that are enclosed within infection threads, rhizobia spreading intercellularly are continuously exposed to the defense system of the plant and therefore need to protect themselves (Leigh and Coplin, 1992). Further experiments with NET30-M1024 mutant might contribute to answer this question.

Acknowledgements

We thank Dr A. Sessitch for providing the plasmid pAS131. Peanut seeds were kindly provided by Ing. Soave (Criadero El Carmen). The authors are grateful to Dr José M. Argüello (Worcester Polytechnic Institute, Worcester, USA) for suggestions and corrections on the manuscript. This work was supported from grants of the ANPCyT, CONICET and SECYT-UNRC. C.M. and J.A. are fellowship from CONICET. A.F. is member of the research career of CONICET, Argentina.

References

- Amemura, A., Mouri, K., Harada, T., 1974. Purification and properties of a specific, inducible β -glucanase, succinoglycan depolymerase, from *Flavobacterium*. *Biochimica et Biophysica Acta* 334, 398–409.
- Arsène, F., Katupitiya, S., Kennedy, I., Elmrch, C., 1994. Use of lacZ fusions to study the expression of nif genes of *Azospirillum brasiliense* in association with plants. *Molecular Plant–Microbe Interaction* 7, 748–757.
- Becker, A., Pühler, A., 1998. Production of exopolysaccharides, in: Spink, H., Kondorosi, A., Hooykaas, J. (Eds.), *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Beringer, J., 1974. R. factor transfer in *R. leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84, 188–189.

- Boogerd, F., van Rossum, D., 1997. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology Review* 21, 5–27.
- Borthakur, D., Baker, C., Lamb, J., Daniels, M., Downie, J., Johnston, A., 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *Rhizobium phaseoli* and is corrected by cloned DNA from *Rhizobium* or the phytopathogen *Xanthomonas*. *Molecular and General Genetics* 203, 320–323.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Breedveld, M., Miller, K., 1994. Cyclic β -glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiology Reviews* 58, 145–161.
- Cermola, M., Fedorova, E., Taté, R., Riccio, A., Favre, R., Patriarca, E., 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13, 733–741.
- Chen, H., Batley, M., Redmond, J., Rolfe, B., 1985. Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range *Rhizobium* due to changes in exopolysaccharide synthesis. *Journal of Plant Physiology* 120, 331–349.
- de Bruijn, F.J., 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2180–2187.
- D'Haese, W., Glushka, J., De Rycke, R., Holster, M., Carlson, R., 2004. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Molecular Microbiology* 52, 485–500.
- Diebold, R., Noel, K., 1989. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analysis and symbiotic behaviour on three hosts. *Journal of Bacteriology* 171, 4821–4830.
- Dische, Z., 1962. General color reactions, *Methods Carbohydrate Chemistry*, vol. 1 1962 pp. 478–492.
- Frayse, N., Couderc, F., Poinot, V., 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry* 270, 1365–1380.
- Gray, J., Rolfe, B., 1990. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Molecular Microbiology* 4, 1425–1431.
- Hitchcock, P.J., Brown, T.M., 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology* 154, 269–277.
- Janecka, J., Jenkis, M., Brackett, N., Lion, L., Ghiorse, W., 2002. Characterization of a *Sinorhizobium* isolate and its extracellular polymer implicated in pollutant transport in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 423–426.
- Kosch, K., Jacobi, A., Parniske, M., Werner, D., Müller, P., 1994. The impairment of the nodulation process induced by a *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide mutant is determined by the genotype of the host plant. *Zeitschrift fuer Naturforschung* 49c, 727–736.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leigh, J., Coplin, D., 1992. Exopolysaccharides in plant-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology* 46, 307–346.
- Leigh, J., Walker, G., 1994. Exopolysaccharide of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in Genetics* 10, 63–67.
- Liu, M., González, J., Willis, L., Walker, G., 1998. A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4600–4602.
- Mazur, A., Król, J., Wielbo, J., Urbanik-Sypniewska, T., Skorupska, A., 2002. *Rhizobium leguminosarum* by *trifolii* PssP protein is required for exopolysaccharide biosynthesis and polymerization. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15, 388–397.
- Parniske, M., Schmidt, P., Kosch, K., Müller, P., 1994. Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by exopolysaccharide-defective exo B mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 7, 631–638.
- Parveen, N., Webb, D., Borthakur, D., 1997. The symbiotic phenotypes of exopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium* sp. strain TAL1145 do not differ on determinate and indeterminate nodulating tree legumes. *Microbiology* 143, 1959–1967.
- Pellock, B., Cheng, H., Walker, G., 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology* 182, 4310–4318.
- Peoples, O.P., Sinskey, A.J., 1989. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of PHB polymerase gene (phbC). *Journal of Biological Chemistry* 264, 15298–15303.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* 17, 200–212.
- Robertsen, B., Aman, P., Darvill, A., McNeil, M., Albersheim, P., 1981. The structure of acid extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiology* 67, 389–700.
- Rolfe, B., Carlson, R., Ridge, R., Dazzo, F., Mateos, P., Pankhurst, C., 1996. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* by *trifolii*. *Australian Journal of Plant Physiology* 23, 285–303.
- Saambrok, J., Fristsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, second ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sessitsch, A., Hardarson, G., de Vos, W., Wilson, K., 1998. Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. *Plant and Soil* 204, 35–45.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1, 784–791.
- Skorupska, A., Derylo, M., Lorkiewicz, Z., 1985. Role of noncarbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Archives of Microbiology* 143, 307–310.
- Sprent, J., de Faria, S., 1988. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant and Soil* 110, 157–165.
- Stacey, G., So, J., Roth, L., Lakshmi, S., Carlson, R., 1991. A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 4, 332–340.
- Taurian, T., Aguilar, O.M., Fabra, A., 2002a. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis* 33, 59–72.
- Taurian, T., Aguilar, O.M., Fabra, A., 2002b. Phylogenetic relatedness of two peanut rhizobia isolates. *Biocell* 26, 95.
- Tavernier, P., Portais, J., Nava Saucedo, J., Courtois, J., Courtois, B., Barbotis, J., 1997. Exopolysaccharides and poly- β -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 21–26.
- Tsai, C., Frasch, C., 1982. A sensitive silver staining for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 119, 115–119.
- Van Dillewijn, P., Soto, M.J., Villadas, P.J., Toro, N., 2001. Construction and environmental release of *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3860–3865.
- van Workum, W., van Slageren, A., van Brussel, J., Kijne, J., 1998. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* by viciae as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11, 1233–1241.
- Vincent, J.M., 1970. *En Manual Práctico de la Rizobiología* Editorial Hemisferio Sur, Bs. As.
- Werner, D., Wilcockson, J., Zimmermann, E., 1975. Adsorption and selection of rhizobia by ion exchange papers. *Archives of Microbiology* 105, 27–32.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I **INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS**

Introducción

1.	Taxonomía de las leguminosas	1
1.1.	El cultivo de maní (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	2
2.	Taxonomía y Filogenia de los rizobios	5
3.	Simbiosis rizobio-leguminosa	7
3.1.	Importancia de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	7
3.2.	Desarrollo de la simbiosis	8
3.2.1.	Comunicación molecular entre los simbioses	8
3.2.2.	Adsorción de los rizobios a las raíces	12
3.2.3.	Mecanismos de infección	13
3.2.4.	Tipos de nódulos	16
3.2.5.	El proceso de fijación de nitrógeno	18
	Objetivos	20

CAPÍTULO II **ESTUDIOS DE LA COMPETITIVIDAD DE AISLAMIENTOS NATIVOS NODULANTES DE MANI**

Introducción.

1.	Beneficios agronómicos de la inoculación con rizobios en cultivos de leguminosas.	21
2.	Sustentabilidad agrícola: la situación actual en los suelos de Córdoba.	22
3.	Competencia rizobiana en la ocupancia de los nódulos	24

Objetivos

28

Materiales y Métodos.

1.	Cepas rizobianas	29
2.	Conservación de los rizobios	29
3.	Medios de cultivo	29
4.	Determinación de la resistencia a antibióticos	30
5.	Esterilización de las semillas de maní	30
6.	Condiciones de cultivo de las plantas	31
7.	Ensayos de competencia	31
8.	Determinación de la ocupancia de nódulos	31
9.	Obtención del templado de ADN	32
10.	Eric-Fingerprint genómico de las cepas aisladas de nódulos	32
11.	Ensayos en microcosmos	33
12.	Ensayos de inoculación a campo	34

13.	Determinación del número más probable (NMP) en muestras de suelo	35
14.	Análisis estadístico	35
Resultados y Discusión		
1.	Competencia entre NCHA22 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en la formación de nódulos	36
2.	Competitividad de NCHA22 frente a rizobios naturalizados en ensayo en microcosmos	41
3.	Comportamiento simbiótico de NCHA22 en ensayo a campo	42

CAPÍTULO III

ROL DE LOS CARBOHIDRATOS DE LA SUPERFICIE CELULAR BACTERIANA EN LA INTERACCIÓN MANÍ- RIZOBIO.

Introducción

1.	Lipopolisacáridos (LPSs)	49
1.1.	Localización celular y estructura química	49
1.2.	Rol en la simbiosis	52
2.	Polisacáridos capsulares (KPSs)	54
2.1.	Localización celular y estructura química	54
2.2.	Rol en la simbiosis	55
3.	β -glucanos cíclicos	55
3.1.	Localización celular y estructura química	55
3.2.	Genes involucrados en su biosíntesis	57
3.3.	Rol en la simbiosis	58
4.	Exopolisacáridos (EPSs)	60
4.1.	Localización celular y estructura química	60
4.2.	Organización genética y función de genes implicados en su biosíntesis.	63
4.3.	Mecanismos de regulación de su biosíntesis.	67
4.4.	Rol en la simbiosis	67

Objetivos

Materiales y Métodos

1.	Microorganismos y plásmidos	73
2.	Conservación de bacterias	74
3.	Medios de cultivo	74
4.	Antibióticos	77
5.	Obtención de mutantes deficientes en la producción de EPSs a partir de aislamientos nativos nodulantes de maní.	77
5.1.	Identificación de mutantes deficientes en la producción de EPSs	78
6.	Obtención de mutantes deficientes en la producción de glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ a partir de aislamientos nativos nodulantes de maní.	78
6.1	Mutagénesis al azar	78
6.2.	Mutagénesis dirigida	79

6.3.	Análisis informático de las secuencias	85
7.	Caracterización fenotípica de la mutante alterada en la producción de exopolisacáridos	85
7.1.	Crecimiento de la mutante en distintas fuentes de carbono	85
7.2.	Determinación del contenido de EPSs	86
7.3.	Análisis de la composición monosacárido de los EPSs por GLC	86
7.4.	Determinación cualitativa de polisacáridos de superficie	87
7.4.1.	β -glucanos cíclicos	87
7.4.2.	Lipopolisacáridos (LPSs)	87
8.	Caracterización genotípica de la mutante	88
8.1.	Rep-fingerprint genómico de la cepa parental y mutante	88
8.2.	Amplificación de secuencias de inserción IS50 mediante PCR	88
8.3.	Estudio de la región génica interrumpida por el mTn5SSce/B31 mediante Southern Blot	90
8.3.1.	Extracción de ADN genómico	90
8.3.2.	Digestión del ADN genómico	90
8.3.3.	Electroforesis en gel de agarosa	91
8.3.4.	Obtención y marcado de la sonda	91
8.3.5.	Transferencia de ADN a membranas de nitrocelulosa	92
8.3.6.	Hibridación de ADN (Southern Blot)	92
9.	Comportamiento simbiótico de la mutante	93
9.1.	Ensayos de nodulación	93
9.1.1.	Esterilización de semillas de maní	93
9.1.2.	Condiciones de cultivo de plantas de maní	93
9.1.3.	Inoculación de plántulas de maní	93
9.2.	Determinación de la supervivencia de la mutante	94
9.3.	Determinación de la competitividad de la mutante	94
9.4.	Histología de nódulos	95
9.4.1.	Microscopía óptica	95
9.4.2.	Microscopía electrónica de transmisión	95
9.5.	Determinación del rol de los EPSs en la protección frente a mecanismos de defensa de las plantas.	96
10.	Análisis estadístico	97
	Resultados y Discusión	
1.	Obtención e identificación de mutantes deficientes en la producción de exopolisacáridos y/o β -glucanos cíclicos a partir de aislamientos nativos nodulantes de maní.	98
1.1.	Obtención de mutantes deficientes en la	98

	producción de β -glucanos cíclicos	
1.2.	Obtención e identificación de mutantes deficientes en la producción de EPSs	104
2.	Caracterización fenotípica de la mutante M1024	106
2.1.	Crecimiento en medios con diferentes fuentes carbonadas	106
2.2.	Contenido de EPSs	107
2.3.	Composición de azúcares de los EPSs sintetizados	109
2.4.	Biosíntesis de β -glucanos cíclicos y LPSs	110
3.	Caracterización genotípica de la mutante M1024	112
4.	Comportamiento simbiótico de la mutante M1024	115
4.1.	Capacidad de nodular maní	116
4.2.	Supervivencia de la mutante M1024	119
4.3.	Competitividad de la mutante M1024	120
4.4.	Características histológicas de los nódulos	122
4.5.	Rol de los EPSs rizobianos en la protección frente a mecanismos de defensa de las plantas	125
	CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES	128
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
	ANEXO	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1	<i>Arachis hypogaea</i> L.	3
Figura I-2	Zona manisera de la provincia de Córdoba	4
Figura I-3	Estructura general de los flavonoides	9
Figura I-4	Esquema general del lipoquitooligosacárido o factor Nod producido por los rizobios	10
Figura I-5	Comunicación molecular en la simbiosis rizobio- leguminosa	11
Figura I-6	Colonización <i>in situ</i> de raíces por una cepa de rizobio bioluminiscente	12
Figura I-7	Mecanismo de infección que involucra la formación de hilos de infección	13
Figura I-8	Esquema de nódulos indeterminados y determinados	17
Figura I-9	Nódulos maduros expresando leghemoglobina	19
Figura II-1	Factores que determinan la competencia entre las distintas cepas de rizobios para la ocupancia de nódulos	25
Figura II-2	Ensayo de competencia para la nodulación	38
Figura II-3	Porcentaje de ocupación de nódulos del aislamiento NCHA22 y la cepa <i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA 6144	39
Figura II-4	ERIC-PCR de los aislamientos de nódulos ocupados por NCHA22.	40
Figura II-5	ERIC-PCR de los aislamientos de nódulos ocupados por <i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA 6144	40
Figura II-6	Sistema radical de plantas de maní cv. ASEM 484 inoculadas con NCHA22 y sin inocular	45
Figura III-1	Estructura química del lipopolisacárido de <i>R. etli</i> CE3	51
Figura III-2	Conformación de máxima simetría y mínima energía de moléculas de β -glucanos cíclicos	56
Figura III-3	Estructura química de exopolisacáridos rizobianos	62
Figura III-4	Modelo sugerido de la posible localización de proteínas Exo que participan en la síntesis del EPSI de <i>S. meliloti</i>	65
Figura III-5	Estrategia de recombinación simple	99
Figura III-6	Electroforesis en gel de agarosa 0.8% del plásmido pCM11 extraído de <i>E. coli</i> #13-1	100
Figura III-7	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>ndvB</i> de <i>S. meliloti</i> 102F34nal y NET30	101
Figura III-8	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>ndvB</i> de <i>S. meliloti</i> 102F34nal y NCHA22	102
Figura III-9	Mapa físico y genético del transposón mTn5SSce/B31	104
Figura III-10	Colonias de M1024 crecidas en medio mínimo MM1	105

	teñidas con Sudan Black B	
Figura III-11	Curva de crecimiento de NET30 y de la mutante M1024 en medio mínimo MM (Manitol)	106
Figura III-12	Curva de crecimiento de NET30 y de la mutante M1024 en medio mínimo MM (Galactosa)	107
Figura III-13	TLC de β -glucanos cíclicos de las cepas silvestre y mutante	111
Figura III-14	Perfil de LPSs en gel de SDS-poliacrilamida 20%	111
Figura III-15	ERIC-fingerprint genómico de la cepa silvestre NET30 y la mutante M1024	112
Figura III-16	Amplificación de las secuencias de inserción IS50 del mTn5SSce/B31	113
Figura III-17	Hibridación de ADN de las cepas silvestre y mutante utilizando la sonda S*	114
Figura III-18	Amplificación de las secuencias IS50 del mTn5SSce/B31	118
Figura III-19	Supervivencia de las cepas silvestre y mutante	119
Figura III-20	Competitividad para la ocupación de nódulos en maní	121
Figura III-21	Microscopía óptica de cortes transversales de nódulos provenientes de plantas inoculadas con NET30 y de nódulos provenientes de plantas inoculadas con M1024	123
Figura III-22	MET de nódulos provenientes de plantas de maní inoculadas con cultivos de NET30 y M1024	124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I-1	Exportaciones de maní de los principales orígenes	3
Tabla I-2	Mecanismos de infección desarrollados en distintas especies de leguminosas	15
Tabla II-1	Resistencia natural de NCHA22 y <i>Bradyrhizobium sp</i> SEMIA 6144 a antibióticos	37
Tabla II-2	Número de nódulos y PSA de plantas cultivadas en suelo no estéril e inoculadas con NCHA22	42
Tabla II-3	Número de nódulos totales y distribución en la raíz de plantas de maní cv. ASEM 485 a los 45 días post-siembra	44
Tabla II-4	Número de nódulos totales y distribución en la raíz de plantas de maní cv. ASEM 485 a los 90 días post-siembra	46
Tabla II-5	PSA y contenido de N de plantas de maní inoculadas con NCHA22	46
Tabla III-1	Propiedades de los genes <i>exo</i> y sus productos génicos, involucrados en la biosíntesis del EPS I en <i>S. meliloti</i> SU47	64
Tabla III-2	Función y localización de las proteínas Exp en <i>S. meliloti</i> SU47	66
Tabla III-3	Porcentaje de identidad del fragmento clonado con secuencias génicas disponibles en el banco de datos	103
Tabla III-4	Contenido de EPSs en bacterias cultivadas en medios con distintas fuentes carbonadas	108
Tabla III-5	Carbohidratos identificados por GLC en EPSs de las cepas silvestre y mutante M1024	109
Tabla III-6	Comportamiento simbiótico de la mutante M1024 cultivada en YEM (Manitol 10 g l ⁻¹)	116
Tabla III-7	Comportamiento simbiótico de la mutante M1024 cultivada en MM1 (Fructosa 1 g l ⁻¹)	117
Tabla III-8	Competitividad de la mutante M1024 en la nodulación de maní	121

ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	Absorbancia
Ac	Ácido acético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARDRA	<i>Amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNm	ARN mensajero
BT	Bacteroides
CPSs	Polisacáridos capsulares
DNTPs	2-deoxirribonucleótidos 5-trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
EPSs	Exopolisacáridos
ERIC	<i>Enterobacteria repetitive intergenic sequences</i>
ES	Error estándar
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalUA	Ácido galacturónico
GLC	<i>Gas liquid chromatography</i>
Glc	Glucosa
GlcA	Glucosamina
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
GlcNonato	Ácido 2-amino-2-deoxiglucónico
ha	Hectárea (s)
HMW	<i>High molecular weight</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
EI	Espacio intercelular
IDT	<i>Integrated DNA Technologies, Incorporation</i>
KDO	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico
KPSs	Polisacáridos capsulares
LMW	<i>Low molecular weight</i>
LPSs	Lipopolisacáridos
Man	Manosa
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MeTal	Metil-6-deoxitalosa
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)
MNR	<i>Magnetic nuclear resonance</i>
MO	Materia orgánica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMP	Número más probable
NPSs	Polisacáridos nodulares
OAc	Ácido oxaloacético
ORF	Marco de lectura abierto
ori	Origen de replicación

PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	<i>Polymease chain reaction</i>
PM	Peso molecular
PSA	Peso seco aéreo
PSN	Peso seco de nódulos
ppm	Partes por millón
Pyr	Ácido pirúvico
QuiNAc	2-N-acetamida-2,6-dideoxiglucosa
REP	<i>Repetitive extragenic palindromic sequences</i>
ROS	Especies reactivas del oxígeno
S	Simbiosoma
SBB	<i>Sudan Black B</i>
SDS	<i>Sodium dodecil sulfato</i>
Succ	Ácido succínico
TBE	Tris-borato-EDTA
TFX	Trifolitoxina
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TMS	Trimetilsilil
UDP	Uridina di fosfato
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Luz ultravioleta
V	Vacuola
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
% p/v	Porcentaje peso en volumen
% v/v	Porcentaje volumen en volumen

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN.

Las interacciones entre especies de organismos pueden establecerse de diferentes formas, incluyendo desde las relaciones más simples hasta aquellas interacciones complejas y altamente integradas en las cuales los organismos que se interrelacionan no pueden vivir aisladamente. Estas últimas se encuentran gobernadas por eventos moleculares que ocurren a nivel celular, y son características de los sistemas simbióticos.

Las asociaciones simbióticas que realizan el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) incluyen tres tipos de interacciones: (1) los heterocistos de las cianobacterias que ocupan tejidos de helechos, cícadras y plantas dicotiledóneas; (2) los hongos actinomicetes miembros de la familia *Frankiaceae* que forman nódulos con plantas actinorríticas (no leguminosas); (3) los rizobios, bacterias pertenecientes al orden *Rhizobiales*, que forman nódulos en plantas leguminosas y en la no leguminosa *Parasponia spp.*

Si bien estas asociaciones son consideradas fuentes importantes de nitrógeno fijado, la simbiosis entre las leguminosas y los rizobios constituye la fuente global más significativa de nitrógeno biológicamente disponible.

Debido a la importancia ecológica y económica de estas relaciones mutualistas, desde hace muchos años los investigadores realizan numerosos estudios moleculares y fisiológicos, tendientes a contribuir al mejor conocimiento de estos procesos.

1. TAXONOMIA DE LAS LEGUMINOSAS.

Las leguminosas pertenecen a una amplia y diversa familia (*Fabaceae*) de plantas dicotiledóneas con flor, la cual contiene 674 géneros con más de 20.000 especies (Allen y col., 1981) y de la que se conocen tres subfamilias: *Caesalpinioideae* y *Papilionoideae*, en las que se ubican principalmente árboles leñosos y arbustos, y *Mimosoideae* que incluye a la mayoría de las leguminosas de granos con importancia agronómica. Más del 90% de las leguminosas de las subfamilias *Mimosoideae* y *Papilionoideae* y sólo el 25% de los miembros de la subfamilia *Caesalpinioideae* forman nódulos cuando

interaccionan con rizobios. Las evidencias fósiles de los antecesores de las leguminosas datan de la era Cretácea, entre 60 a 145 millones de años atrás, y se cree que la divergencia de las tres subfamilias ocurrió hace 50 millones de años (Sprent y Raven, 1992).

El origen geográfico de las especies de leguminosas es amplio ya que provienen de diferentes regiones del mundo. Por ejemplo, la soja (*Glycine max*) proviene de Asia, el poroto (*Phaseolus vulgaris*) tiene su origen en Mesoamérica y en la región andina de América del Sur, mientras que las plantas de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) se habrían originado en África.

1.1. El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.)

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es originario del Noroeste andino de Argentina y Bolivia.

En Argentina, desde el año 1940 al 1974, el rendimiento de este cultivo por unidad de superficie se mantuvo en los 752 Kg ha⁻¹, con una tasa de crecimiento anual de 1.8 Kg ha⁻¹. A partir de 1975 se introdujeron importantes cambios en su manejo que originaron un rápido aumento de la productividad, con una alta tasa de crecimiento anual de los rendimientos que en la campaña 1995/1996 alcanzaron los 1940 Kg ha⁻¹. En la campaña 2004/2005 se cosecharon 700.000 Tn de maní en caja obteniendo un promedio record de 4000 Kg ha⁻¹ (Ackermann, B., 2005).

El marcado mejoramiento cualitativo que logró el sector manisero en la década de los '90 y la excelente calidad lograda, contribuyeron definitivamente al liderazgo alcanzado por Argentina en el mercado internacional, consolidándose como segundo exportador mundial (tabla I-1) y principal proveedor de la Comunidad Europea.

Tabla I-1. Exportaciones de maní de los principales orígenes (en Tn)

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
CHINA	150.000	340.560	399.970	706.000	770.000	761.000	690.000
ARGENTINA	312.707	233.128	254.777	226.060	201.050	202.652	176.311
ESTADOS UNIDOS	210.000	207.095	253.678	158.406	252.986	148.023	184.363

Fuente: Ackermann, B. (2005).

Características del cultivo y región productora.

Arachis hypogaea L. es una planta herbácea anual de 15 – 70 cm de alto, que progresa bien en zonas de clima cálido, con temperaturas que oscilan entre los 21° a 27°C.

Las hojas son uniformemente pinnadas con dos pares de folíolos. Posee una floración aérea y desarrollo de frutos debajo de la tierra. Las vainas, que se encuentran enterradas debajo de la superficie del suelo, alcanzan una longitud de hasta 7 cm de largo con 1 – 4 semillas en su interior.

El maní se diferencia de otras leguminosas en cuanto a los requerimientos del suelo. Éste debe ser arenoso, fértil, bien drenado, libre de sales, con alto contenido de Ca^{+2} , PO_4^{-3} y K^+ y pH 6.5 – 7.

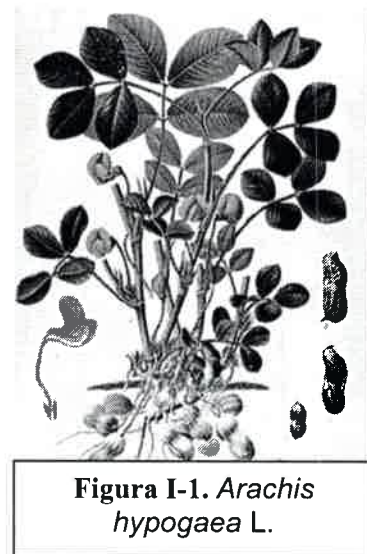


Figura I-1. *Arachis hypogaea* L.

Si bien se dispone de 4 tipos comerciales de maní (Virginia, Runner, Valencia y Español), en la región manisera de Córdoba sólo se cultivan dos de ellos: Runner (cultivares Florman INTA, Tegua, Nahuel y Florunner) y Valencia (cultivar Colorado irradiado INTA) (Giandana y col, 1997).

El 90% del maní procesado en las plantas seleccionadoras con destino al consumo humano (maní confitería) pertenece al tipo "runner". Su ciclo de vida se divide en dos etapas, *vegetativo* (hojas y tallos) y *reproductivo* (flores, clavos

y vainas). El alargamiento de los tallos y crecimiento del área foliar se completa aproximadamente a los 110 días después de la siembra, cuando las condiciones de humedad son adecuadas (requerimiento de agua de 500 mm). Luego de producirse la autopolinización de las flores, los ovarios comienzan a alargarse originando los "clavos" que penetran en el suelo hasta unos 3 a 5 cm de profundidad. Posteriormente comienza el período de formación de vainas y maduración de las semillas, que se extiende entre los 60 y 100 días después de la siembra coincidiendo con el cese del crecimiento vegetativo (INTA Manfredi, 1997).

Aproximadamente el 94% del maní producido en Argentina se obtiene en la provincia de Córdoba (Cisneros, 2001) (figura I-2) ya que ésta reúne excelentes condiciones agroclimáticas para la obtención de un producto de alta calidad.

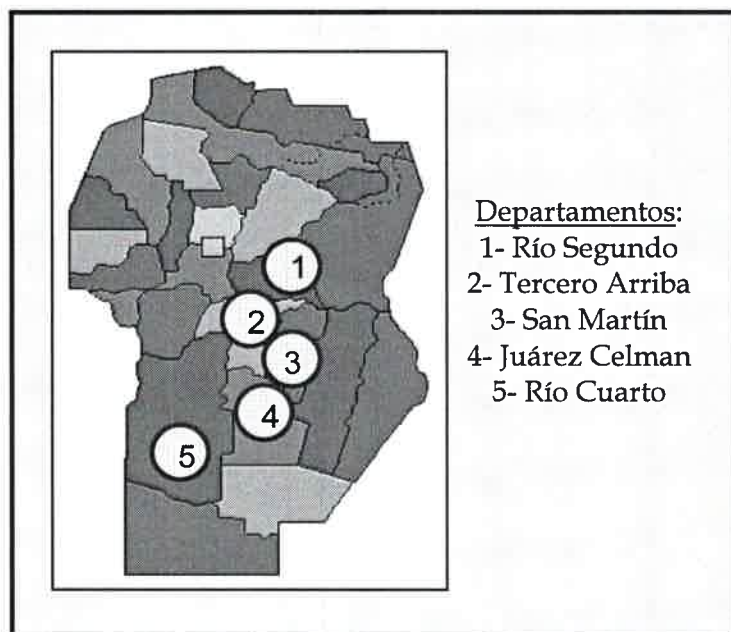


Figura I-2. Zona manisera de la provincia de Córdoba.

Desde los últimos 40 años, el área de cultivo de maní en Córdoba ha sufrido importantes cambios en su localización geográfica. Durante las décadas de 1950 y 1960 la siembra de este cultivo se concentraba fundamentalmente en los departamentos de las áreas norte (Santa María y Río Segundo) y central

(Calamuchita, Tercero Arriba y General San Martín) de la región productora (Cámara Argentina de Maní, 1989). Sin embargo, en 1980 se registró una marcada disminución de la superficie sembrada en estas zonas y un incremento del 25% en el sur de la provincia (Río IV y Juárez Celman). En la última campaña del siglo XX, se acentuó aún más este desplazamiento hacia el área sur y sureste, alcanzando la superficie sembrada valores cercanos al 50% respecto del 8% y 35% correspondiente a las áreas norte y centro, respectivamente. Ello se relacionaría con una mayor concentración de infraestructuras de procesamiento y exportación, con una ocupación de mano de obra en los departamentos de Río IV y Juárez Celman (March y Marinelli, 2005).

Hacia fines del año 1998, la superficie sembrada de maní en la provincia de Córdoba alcanzó un máximo de 402.000 ha, pero en la campaña 2002/03 el área sembrada se redujo a 155.000 ha, probablemente a consecuencia de la compleja crisis del sector (Busso y col., 2004). A ello se suma el uso de prácticas agrícolas inadecuadas así como el crecimiento exponencial del cultivo de soja, que provocaron cambios en la constitución físico-química del suelo, conduciendo a su degradación (Pengue, W., 2002). No obstante, en la campaña 2004/2005, la superficie destinada a la producción de maní en nuestra provincia alcanzó las 215.000 ha (Ackermann, B., 2005)

2. TAXONOMIA Y FILOGENIA DE LOS RIZOBIOS.

Los rizobios son bacilos gramnegativos, móviles con flagelación peritrica, polar o subpolar. El hábitat natural es el suelo en donde viven como organismos de vida libre, proliferando en la rizósfera de las plantas. Pueden además, invadir células vegetales de plantas leguminosas y vivir como simbiontes fijadores de nitrógeno en el interior de nódulos que se desarrollan en raíces y tallos de estas plantas.

Inicialmente, la clasificación de los rizobios se basó fundamentalmente en el tipo de leguminosa de la cual habían sido aislados. Recién a partir de 1960 se comenzaron a utilizar criterios microbiológicos para su clasificación. Con el

advenimiento de la rizobiología moderna, se demostró que cada especie de rizobio no está restringida a un único huésped, sino que muchos de ellos son promiscuos y, por lo tanto, capaces de nodular distintos géneros de leguminosas.

En la última década un gran número de nuevas especies y géneros de rizobios fueron descritos gracias al aislamiento de bacterias a partir de nódulos de leguminosas que no habían sido estudiadas previamente y a las rápidas y eficientes técnicas de secuenciación del gen *16S ARNr* o de genes simbióticos (*nifH*, operón *nodABC*, etc) (Weisburg y col., 1991; Turner y Young, 2000; Young y col., 1991; Haukka y col., 1998; Laguerre y col., 2001).

El término “rizobios” comprende a un grupo heterogéneo y polifilético de microorganismos pertenecientes a la división *Proteobacteria*, subdivisión α -proteobacteria, orden *Rhizobiales* (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Willems y Collins, 1993; Young y Haukka, 1993). En dicho grupo, los rizobios se ubican en los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* (familia *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium* (familia *Phylobacteriaceae*), *Bradyrhizobium* (familia *Bradyrhizobiaceae*); *Azorhizobium* (familia *Hyphomicrobiaceae*). Actualmente, se ha propuesto que la única especie del género *Allorhizobium* (*A. undicola*) sea ubicada en el género *Rhizobium* sobre la base de la secuencia del gen *16S ARNr* (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Los estudios taxonómicos realizados a partir de la comparación de secuencias del gen *16S ARNr*, permitieron identificar dentro de esta subdivisión a otras bacterias capaces de nodular y fijar N en simbiosis, pertenecientes a los géneros *Devosia* y *Methylobacterium*, representados cada uno de ellos por una única especie, *D. neptunia* sp. nov y *M. nodulans* sp. nov, respectivamente (Rivas y col., 2003; Sy y col., 2001).

Sorprendentemente, recientes investigaciones permitieron identificar dentro de la subdivisión β -proteobacterias a dos especies del género *Burkholderia* (*B. tuberum* y *B. phymatum*) capaces de nodular leguminosas (Vandamme y col., 2002) y ocho aislamientos de nódulos de *Mimosa* spp. identificados como *Ralstonia taiwanensis* (recientemente renombrada como *Wautersia taiwanensis* (Vaneechoutte y col., 2004). Más tarde, Benhizia y col.

(2004) proporcionaron la primer evidencia de que bacterias de la subdivisión β - proteobacteria correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Leclercia*, *Pantoea* y *Enterobacter* ocupaban nódulos de plantas leguminosas (*Hedysarum sp.*), con lo cual ya no sería válido el concepto sostenido durante décadas de que las bacterias capaces de nodular leguminosas se ubican sólo en la subdivisión α - proteobacteria. La expansión de esta capacidad a miembros de las subdivisiones β y γ -proteobacteria plantea dos hipótesis acerca de su probable origen. Es posible que la capacidad de nodular leguminosas sea un carácter ancestral dentro de la división *Proteobacteria* y por lo tanto, queden aún por identificarse nuevas especies de microorganismos diazotófos (Chen y col., 2003). Otra hipótesis sugiere que la adquisición de la capacidad simbiótica en bacterias saprófitas sería el resultado de numerosos eventos de transferencia horizontal de genes o plásmidos simbióticos (Kinkle y Schmidt, 1991), contribuyendo a la aparición de nuevos linajes dentro de las proteobacterias (Groisman y Ochamn, 1996). La presencia en α y β - rizobios de genes de fijación de N filogenéticamente relacionados entre sí refuerza esta hipótesis, aunque actualmente no se conoce con precisión cómo ocurrieron dichos eventos de transferencia simple de genes entre estas dos subdivisiones (Chen y col., 2003).

El hallazgo de nuevos microorganismos diazotófos extiende ahora la diversidad filogenética de los rizobios, y deja abierta la posibilidad de que otros géneros puedan agregarse a este grupo heterogéneo, ya que aún deben ser estudiados numerosas especies de leguminosas y nuevos ambientes.

3. SIMBIOSIS RIZOBIO - LEGUMINOSA.

3.1. Importancia de la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN).

Mediante el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), los rizobios que se asocian simbióticamente a leguminosas fijan el N atmosférico y lo transforman en amonio, útil para las plantas. Las bacterias obtienen nutrientes de la planta huésped para su crecimiento y, además, permanecen protegidas

frente a las condiciones de estrés externas. Se ha establecido que la tasa de fijación del N_2 oscila entre los 50-200 Kg ha⁻¹ año⁻¹, lo cual reduce la necesidad de las plantas de obtener esta molécula a partir del suelo así como de realizar fertilización con nitrógeno. Así, el aporte de la FBN a los ecosistemas terrestres supera las 100 millones de toneladas por año, resultando en una práctica económicamente viable y de real importancia para el mantenimiento de una agricultura sustentable.

3.2. Desarrollo de la simbiosis.

3.2.1. Comunicación molecular entre los simbiosites.

Mediante análisis moleculares se demostró que las etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (atracción del microorganismo a la planta, adherencia y colonización), requieren de un intercambio de señales químicas entre los dos simbiosites (Fischer y Long, 1992).

Las leguminosas liberan una serie de moléculas que son reconocidas por los rizobios que se encuentran colonizando las cercanías de la raíz. La naturaleza y cantidad de los componentes del exudado radical varía según la planta y su estado de desarrollo. Entre los compuestos exudados se encuentran aminoácidos, CO₂, hormonas, ácidos orgánicos, sustancias fenólicas, azúcares, vitaminas, etc, como así también polisacáridos y proteínas (Phillips y col., 1996; 1997). Entre otros roles, el eflujo de estas fuentes carbonadas estimula el crecimiento rizobiano y contribuye a la atracción de los microorganismos (mutualistas o patógenos) hacia las raíces. En las secreciones de las plantas se han identificado además, una amplia gama de metabolitos secundarios, los flavonoides, que actuarían como moléculas señal durante las primeras etapas del establecimiento de la simbiosis. Su estructura química consiste en dos anillos de benceno unidos a través de un anillo heterocíclico de pirano o pirona. Las distintas sustituciones específicas de los anillos permite clasificar a los flavonoides en las subclases chalconas,

flavonas, flavononas e isoflavonas (Gottfer, 1993), sintetizados exclusivamente por leguminosas (Figura I-3). A pesar de que los flavonoides son producidos constitutivamente, sus niveles pueden ser modulados por la presencia de microorganismos o por diferentes situaciones estrés ambiental (Koes y col., 1994).

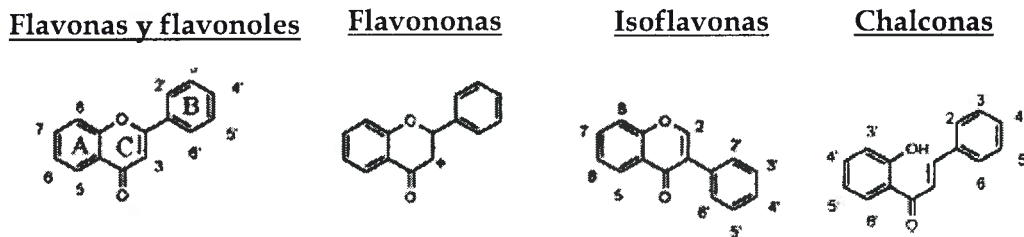


Figura I-3. Estructura general de los flavonoides.

Los flavonoides se consideran los inductores más potentes de la expresión de genes de nodulación bacterianos (*nod*, *noe* y *nof*) (Rolfe, 1988; Phillips y col., 1992; Stafford y col., 1997) a través de un factor de transcripción codificado por el gen *nodD* (un regulador del tipo LysR) (Spaink, H., 2000). Luego de que la proteína NodD sensa las moléculas señales liberadas por las plantas, sufre un cambio conformacional y se une a los promotores de los genes *nod* permitiendo su transcripción. A pesar de que el gen *nodD* está presente en todos los rizobios, confiere características simbióticas que varían de una especie a otra. La especie *R. leguminosarum* *bv. trifolii*, posee un único gen *nodD*, y por lo tanto, una mutación del mismo confiere a la bacteria un fenotipo Nod⁻ (que se expresa por su incapacidad de nodular). Por el contrario, especies como *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium tropici* poseen entre dos a cinco copias del gen *nodD*.

Los flavonoides son considerados determinantes de amplio rango de la especificidad de huésped (Lorkiewicz, 1997). Las isoflavonas de soja (daidzeina y genisteina) demostraron ser inductores efectivos de los genes *nod* de *Bradyrhizobium japonicum* e inhibidores de dichos genes en *Sinorhizobium meliloti*, los que en cambio, son inducidos por luteolina (Hirsch y col., 2001). Más aún, se han identificado compuestos distintos de los flavonoides, como

betaína y ácido hidroxicinámico, que actuarían como inductores de los genes *nod* (Phillips y col., 1992; Kape y col., 1991). No obstante, los determinantes más efectivos de especificidad huésped-bacteria, serían enzimas bacterianas codificadas por los genes *nod* que posibilitan la síntesis bacteriana de los factores Nod. Estos factores de nodulación son lipoquitoligosacáridos de bajo peso molecular que consisten en cuatro o cinco residuos de β -1-4 N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y portan en el extremo terminal no reducido una cadena de ácidos grasos (Figura I-4). Dependiendo de la combinación de genes *nod* presentes en las distintas especies rizobianas, la estructura de la molécula puede presentar diferentes sustituciones específicas (sulfatación, fucosilación, acetilación) tanto en el extremo reductor como no reductor. Ello resulta de gran importancia en la especificidad de la interacción rizobio-leguminosa (Spaink H, P., 2000).

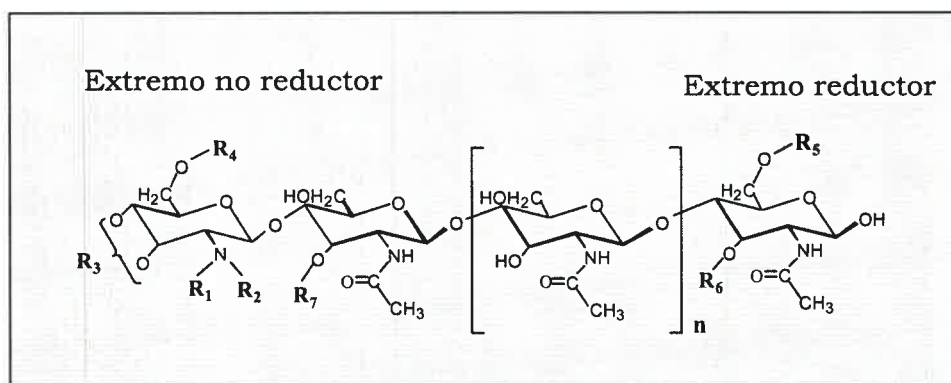


Figura I-4. Esquema general del lipoquitoligosacárido o factor Nod producido por los rizobios. (n) 1 a 4 residuos. (R) sustituyentes incorporados específicamente por las distintas cepas de rizobios.

Entre las respuestas tempranas de las plantas a los factores Nod se incluyen (Gage, 2004):

- i) El flujo de iones a través de la membrana plasmática y una depolarización transitoria asociada al flujo de iones Cl^- y K^+ . Estos cambios son seguidos por una alcalinización del citoplasma y luego por oscilaciones periódicas en el nivel de calcio intracelular, conocida como "calcium spiking".

- ii) La deformación de los pelos radicales (figura I-5) e inicio de la división de células corticales.
- iii) El curvamiento del pelo radical (figura I-5) y la activación de células del periciclo.
- iv) La inducción en las plantas de los denominados genes nodulina de expresión temprana (ENOD, early nodulin genes). Dado que las nodulinas se expresan de manera diferencial a lo largo del desarrollo del nódulo, se las ha dividido en nodulinas tempranas y tardías.
- v) La formación del hilo de infección (figura I-5).
- vi) La organogénesis del nódulo simultáneamente con la infección.

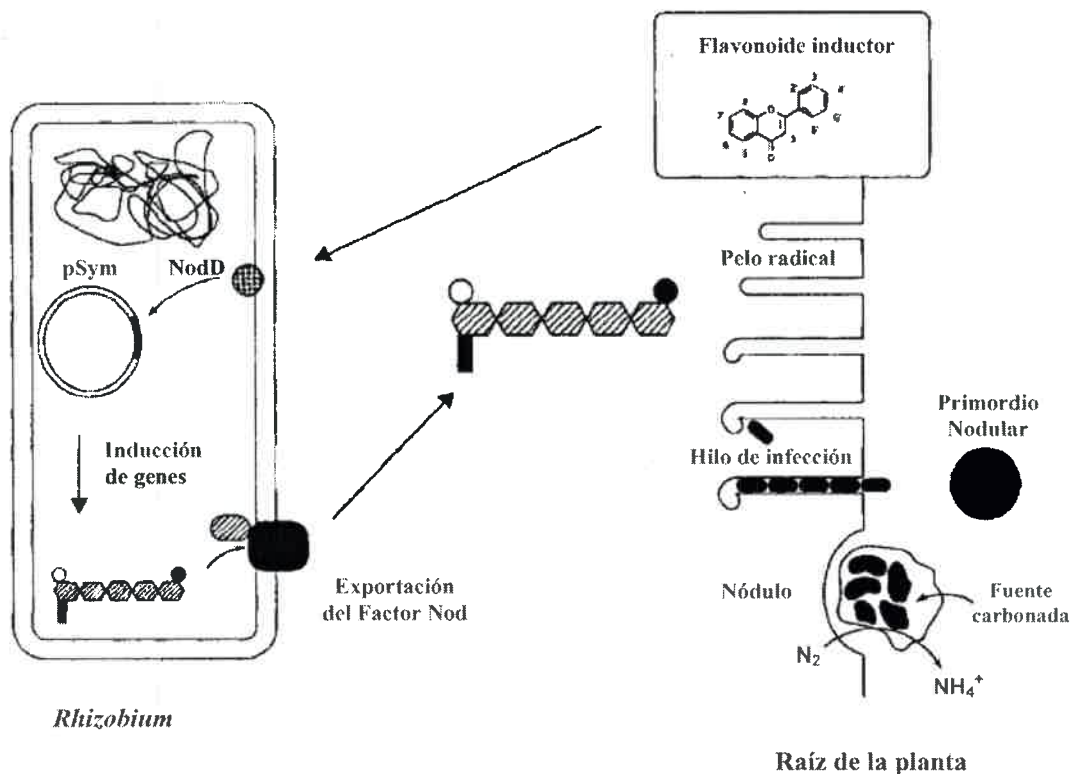


Figura I-5. Comunicación molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa.

3.2.2. Adsorción de los rizobios a las raíces.

Para establecer una simbiosis efectiva, los rizobios deben ser capaces de adherirse a la superficie de los pelos radicales de la planta hospedadora.

Durante este proceso de adsorción se pueden distinguir dos etapas: inicialmente los rizobios se unen en forma laxa a la raíz y luego de algunas horas de contacto, esta unión se hace más firme, de modo que la remoción de las bacterias adheridas a la superficie vegetal resulta difícil (Dazzo y cl., 1984; Smit y col., 1992). Se ha descrito la participación de:

- (a) lectinas y aglutininas vegetales, cuyo rol simbiótico es el reconocimiento y unión a carbohidratos específicos presentes en la superficie bacteriana (Dazzo y Truchet, 1983; van Rhijn y col., 1998, 2001).
- (b) proteínas bacterianas, colectivamente conocidas como adhesinas, en particular la proteína dependiente de Ca^{+2} *ricadhesina* (Smit y col., 1992; Lodeiro y col., 2000; Dardanelli y col., 2003) y fibrillas de celulosa de superficie celular (Ausmees y col., 1999; Laus y col., 2005)

En la segunda etapa, luego de un tiempo más prolongado, se produce la colonización del pelo radical con un mayor número de bacterias adheridas, capaces de infectar la raíz de la leguminosa (Figura I-6)

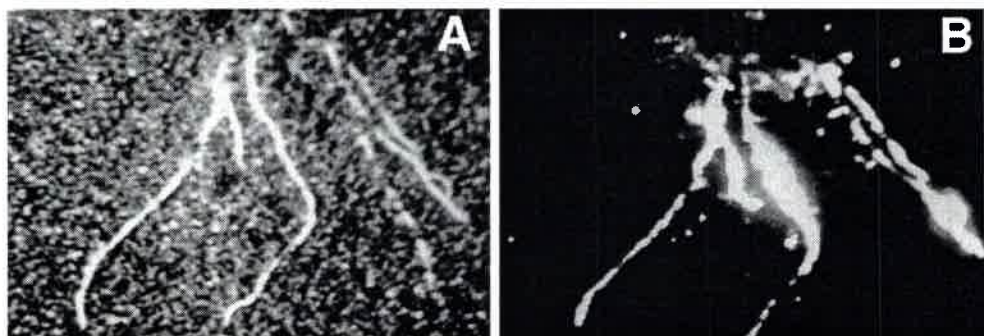


Figura I-6. Colonización *in situ* de raíces por una cepa de rizobio bioluminiscente (marcada con los genes *lux*) (A) fotografía en luz; (B) fotografía de bioluminiscencia en oscuridad (Chabot y col., 1996).

3.2.3. Mecanismos de infección.

Se han descrito al menos tres mecanismos de infección por los cuales los rizobios infectan las leguminosas (Tabla I-2). El más estudiado involucra la formación de una estructura tubular, conocida como hilo de infección, dentro del cual los rizobios avanzan hacia la zona cortical o subcortical, e invaden nódulos en desarrollo.

En las plantas que forman nódulos *indeterminados* el hilo de infección que contiene a los rizobios crece desde el pelo radical hacia el primordio del nódulo localizado en la corteza interna (figura I-7). Allí, los rizobios son liberados al citoplasma de la célula huésped, rodeados por una membrana derivada de la planta llamada membrana peribacteroide. En este estadio, los rizobios se diferencian en su forma endosimbiótica, los llamados bacteroides, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. En las leguminosas que forman nódulos *determinados*, los rizobios inducen el curvamiento del pelo radical inmediatamente después que éste emerge, por lo que el hilo de infección se inicia en la base del pelo radical.

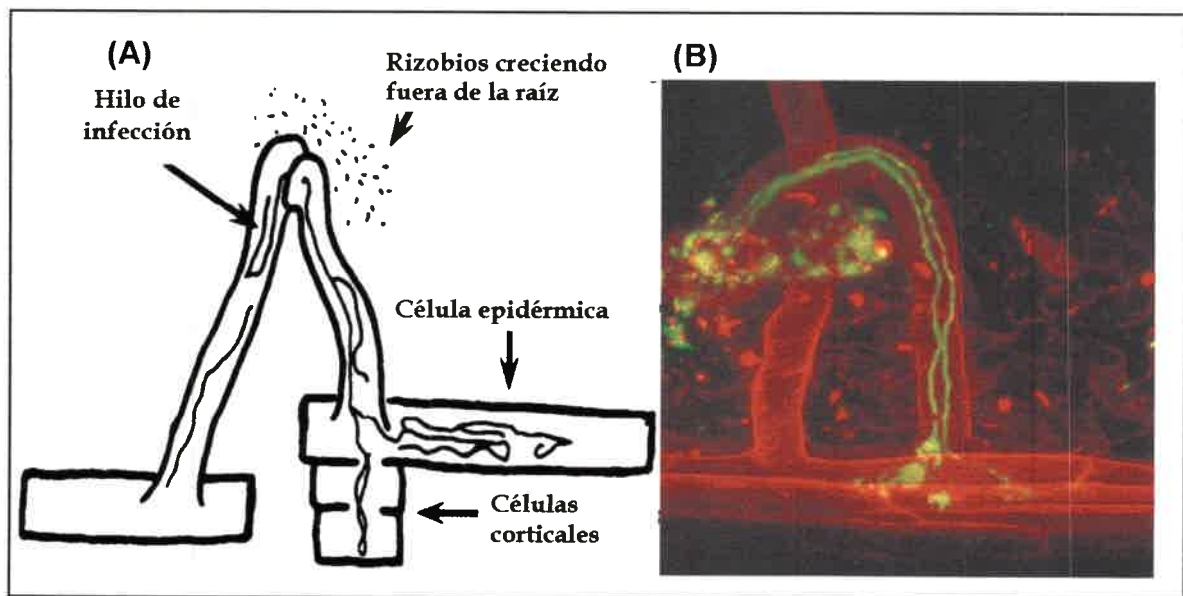


Figura I-7. Mecanismo de infección que involucra la formación de hilos de infección. (A) diagrama esquemático que muestra al hilo de infección invadiendo células hipodérmicas en la región del primordio del nódulo; (B) microfotografía de raíces

infectadas con rizobios que expresan la proteína fluorescente verde. El hilo de infección se extiende a lo largo del pelo radical (Gage y col., 1996)

Si bien la formación de hilos de infección constituye la vía de entrada más común de los rizobios en numerosas leguminosas, Chandler, M. (1982) y Boogerd y van Rossum (1997) han estudiado un mecanismo alternativo de infección, denominado "Crack entry". Mediante este mecanismo, la penetración de los rizobios ocurre a nivel de los sitios de formación de las raíces laterales, como en el caso de maní (*Arachis hypogaea* L), debido a las rupturas o fisuras ("crack") producidas en las células epidérmicas de raíces laterales por la emergencia de los pelos radicales axilares. Posteriormente, la colonización del cortex de la raíz ocurre por invasión de espacios intercelulares y desplazamiento bacteriano a nivel de la laminilla media de las células corticales. Conjuntamente ocurre la dispersión intercelular, los rizobios se rodean de una matriz densa constituida por fragmentos de células vegetales rotas, exopolisacáridos y polisacáridos capsulares bacterianos. Finalmente, la penetración ocurre en las células del huésped que poseen su pared celular parcialmente degradada por acción de endoglicanasas y exoglicanasas bacterianas. A medida que se produce la internalización, la matriz que recubre a las bacterias es rodeada por una segunda membrana derivada del huésped. Las bacterias encapsuladas se dividen rápidamente, inicialmente todas juntas y, finalmente, la envoltura también se divide permitiendo que las bacterias se separen. La célula vegetal invadida se divide rápidamente, contribuyendo de este modo con la distribución de los endofitos que posteriormente se diferenciarán en bacteroides. Un mecanismo similar pero no idéntico ha sido descrito en plantas subtropicales de *Stylosanthes spp.* (Chandler y col., 1982) y *Aeschynomene spp.* (Alazard y Duhoux, 1990) mediante el cual los microorganismos no siguen el camino célula a célula a través de la formación de hilos de infección.

Tabla I-2. Mecanismos de infección desarrollados en distintas especies de leguminosas (Boogerd y van Rossum, 1997).

Penetración en el córtex radical	Penetración en el primordio nodular	Distribución en los nódulos	Ejemplos
Hilos de Infección	<ul style="list-style-type: none"> ● Hilos de Infección ● Intercelular 	<ul style="list-style-type: none"> ● Hilos de Infección ● Hilos de Infección cortos, división de las células vegetales 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Medicago sativa</i> ● <i>Pisum sativa</i> ● <i>Trifolium spp.</i> ● <i>Galega spp.</i> ● <i>Glycine max</i> ● <i>Lotus sp.</i> ● <i>Phaseolus vulgaris</i> ● <i>Vigna radiata</i>
“Crack entry”	<ul style="list-style-type: none"> ● Intercelular 	<ul style="list-style-type: none"> ● Hilos de Infección ● Hilos de Infección cortos ● A través de paredes celulares alteradas, división de las células del huésped 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Sesbania rostrata</i> ● <i>Neptunia spp.</i> ● <i>Arachis hypogaea</i> ● <i>Stylosanthes spp.</i>
Entre células epidérmicas	<ul style="list-style-type: none"> ● Intercelular 	<ul style="list-style-type: none"> ● Estructuras similares a hilos de infección. 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Mimosa scabrella</i>

Un tercer mecanismo directo de infección que ocurre a través de epidermis no dañadas ha sido descrito para la leguminosa arbórea *Mimosa scabrella* (de Faria y col., 1988) la cual no produce pelos radicales regularmente, ni tampoco nódulos asociados con las raíces laterales (Sprent, 1989).

3.2.4. Tipos de nódulos.

Actualmente se asume que las características de infección y el patrón de formación del nódulo está determinado por el genotipo de la planta hospedante (Kijne, 1992). Las sucesivas divisiones mitóticas de las células corticales, inducidas por los factores Nod, conducen a la formación de un meristema cuya función es generar el tejido en crecimiento del nódulo. Según sea el tipo de célula subcortical que comienza a dividirse (células del córtex externo o interno), pueden desarrollarse dos tipos de nódulos diferentes, los *determinados* y los *indeterminados* respectivamente, que comparten no obstante, características anatómicas y morfológicas básicas (Patriarca y col., 2002):

- *Nódulos indeterminados*: mantienen un meristema apical persistente que resulta en estructuras cilíndricas o elongadas y presentan cuatro zonas diferentes en su sección longitudinal: (I) meristemática, (II) de infección, (III) de fijación de nitrógeno, (IV) de senescencia (figura I-8A). En la periferia de los nódulos indeterminados, se encuentran las células vacuoladas del cortex y los haces vasculares y hacia el interior, la endodermis y el parénquima. Las plantas que forman este tipo de nódulos son principalmente leguminosas de clima templado, tales como *Vicia spp.*, *Trifolium spp.*, *Pisum spp.*, *Medicago spp.*
- *Nódulos determinados*: debido a que no poseen un meristema apical persistente, las divisiones celulares cesan. Por lo tanto el crecimiento de los nódulos se produce a expensas de la expansión celular. Se caracterizan por su forma esférica y globosa (figura I-8B). En estos nódulos, las células infectadas más jóvenes están inmediatamente por debajo del tejido periférico, los simbiosomas funcionales en una zona intermedia y los simbiosomas senescentes se encuentran en la región central. A diferencia de lo que ocurre en nódulos indeterminados, los simbiosomas funcionales pueden tener más de un bacteroide en su interior. Las plantas que originan este

tipo de nódulos pertenecen a géneros de clima tropical o subtropical, tales como *Phaseolus spp.*, *Glycine spp.*, *Macroptilium spp.*, *Vigna spp.*, *Lotus spp.*, *Pueraria spp.*, *Arachis spp.*

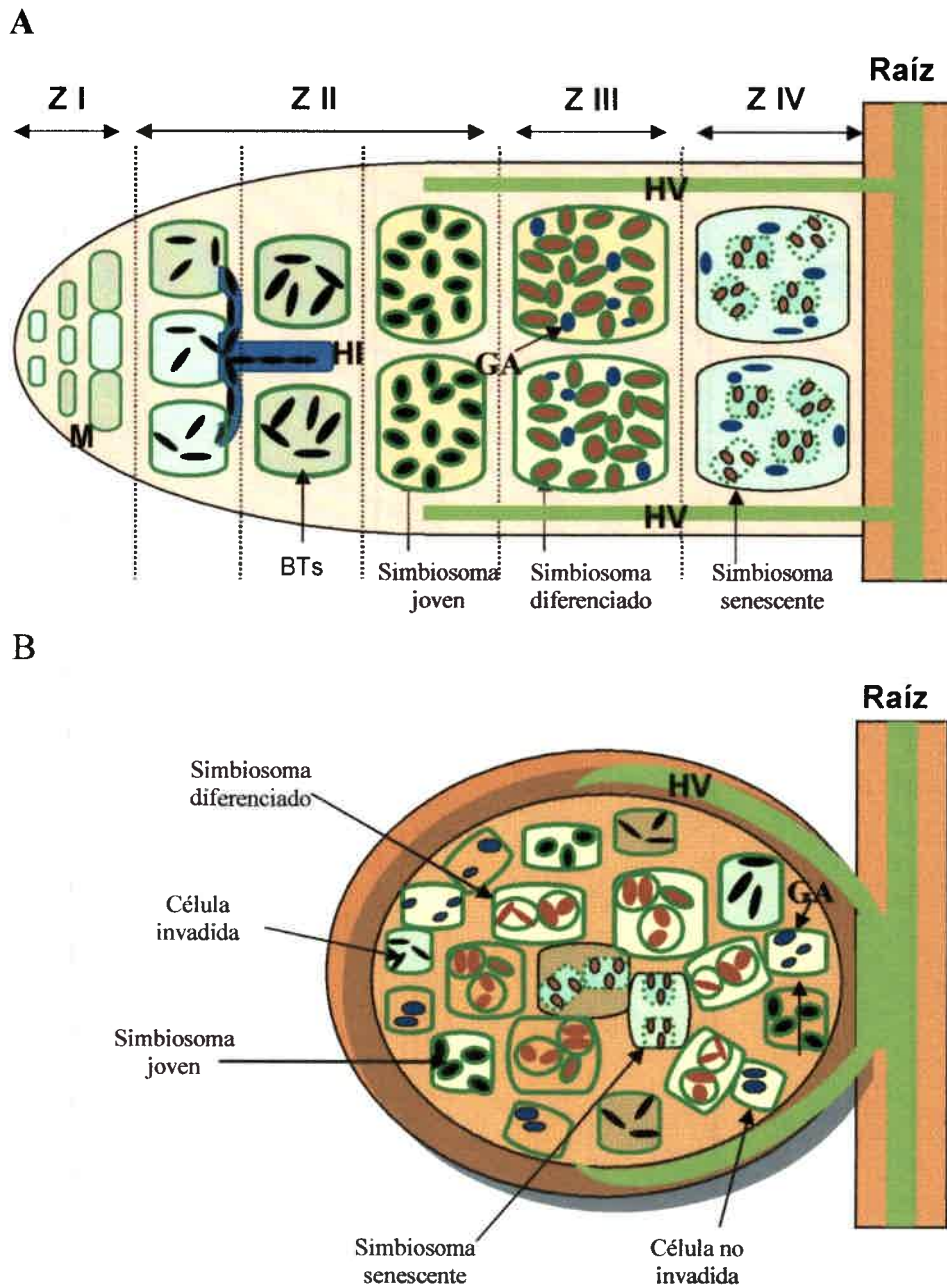


Figura I-8. (A) Esquema de nódulos indeterminados. **(B)** Esquema de nódulos determinados. Abreviaturas: M, meristema; HI, hilo de infección, BTs, bacteroides; GA, gránulos de almidón; HV, haz vascular; Z, distintas zonas del nódulo.

3.2.5. El proceso de fijación de N.

A medida que se produce la internalización de las bacterias en el citoplasma de las células del primordio del nódulo, éstas son envueltas por una membrana de origen vegetal, llamada membrana peribacteroidal, cuya composición de fosfolípidos y proteínas difiere de la membrana plasmática bacteriana (Hernández y col., 1995; Cermola y col., 2000). Una vez rodeados por esta membrana, los rizobios pueden dividirse pocas veces y, posteriormente, detener estas divisiones para diferenciarse morfológica y fisiológicamente en bacteroides. De este modo, constituyen una estructura denominada *simbiosoma*, en cuyo interior, los bacteroides son capaces de reducir el N₂ atmosférico y liberar el N fijado a la planta.

La habilidad de los bacteroides para fijar N₂ se debe a la expresión de la enzima nitrogenasa que cataliza la reducción de N₂ atmosférico a NH₃:



La nitrogenasa es un complejo multienzimático que cataliza varias etapas de la reacción. Esta enzima está constituida por dos componentes un homodímero de una hierro-proteína que une ATP y que está codificada por el gen *nifH* y un heterotetrámero de una molibdeno- hierro – proteína, codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Cebolla y Palomares, 1994; Halbleib y Ludden, 2000). Debido a que la nitrogenasa es altamente sensible al O₂ y se desnaturaliza irreversiblemente, en el córtex externo del nódulo existe una capa de células que actúa como barrera de difusión frente a esta molécula. Por otro lado, dado que este proceso de fijación de N₂ requiere de 16 moléculas de ATP por mol de N₂ reducido, los bacteroides deben desarrollar un metabolismo oxidativo para producir esta cantidad de energía. La proteína hémica leghemoglobina facilita la difusión de muy bajas concentraciones de O₂ hacia los bacteroides diferenciados (Kundu y col., 2003) y, de este modo, es posible mantener una baja presión parcial de este gas en el interior del nódulo. Dado que esta

proteína es de color rojo, la actividad fijadora de N_2 en los nódulos es fácilmente detectable por una coloración rosa en su interior (Figura I-9).

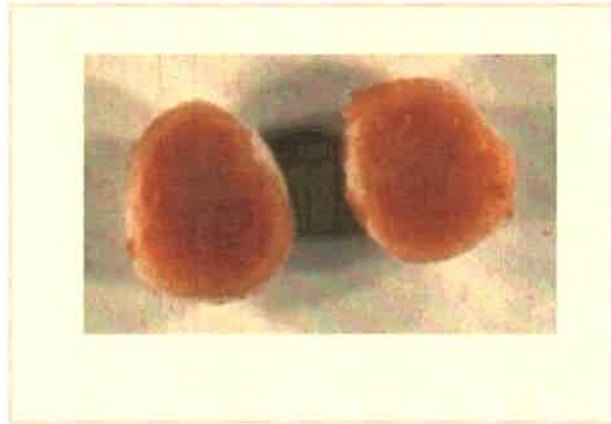


Figura I-9: Nódulos maduros de color rosado evidenciando la producción de leghemoglobina

El NH_3 es el primer producto estable que resulta del proceso de fijación de N y es mayoritariamente transportado a la planta. Una vez en el citoplasma de las células vegetales, el amonio es convertido en diferentes compuestos como aminoácidos y ureidos, que constituyen las principales fuentes de N para las plantas.

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

Objetivo General.

- *Realizar estudios básicos y aplicados sobre la interacción simbiótica rizobio-maní con potencialidad de aflicción tecnológica para mejorar la productividad en el área manisera de la provincia de Córdoba.*

Objetivos Específicos.

- *Seleccionar cepas nativas provenientes de suelos del área manisera de Córdoba, eficientes en la FBN en maní y tolerantes a condiciones ambientales adversas, para la utilización como inoculantes.*
- *Establecer el rol simbiótico de polisacáridos de superficie bacteriana en el mecanismo de infección por crack entry.*



CAPÍTULO II

ESTUDIOS DE LA COMPETITIVIDAD DE AISLAMIENTOS NATIVOS NODULANTES DE MANÍ

1. BENEFICIOS AGRONÓMICOS DE LA INOCULACIÓN CON RIZOBIOS EN CULTIVOS DE LEGUMINOSAS.

El nitrógeno es uno de los constituyentes esenciales de los seres vivos, siendo un elemento clave en la composición de las proteínas y los ácidos nucleicos.

El nitrógeno fijado en compuestos inorgánicos del suelo se encuentra generalmente en bajos niveles, resultando en un factor limitante para el crecimiento de las plantas. Son variadas las formas mediante las cuales se pierde nitrógeno del suelo: desnitrificación por fuga biológica de N_2 y N_2O como consecuencia de la respiración anaeróbica, volatilización de nitrógeno en ambientes de altas temperaturas, etc. Así, las grandes variaciones que experimenta el contenido de nitrógeno en el suelo pueden conducir a niveles limitantes para el crecimiento vegetal.

La pérdida constante de este elemento a la atmósfera es compensada por la fijación de nitrógeno. La energía requerida en este proceso para la ruptura del triple enlace de la molécula de nitrógeno, proviene de distintas fuentes, siendo los principales mecanismos los siguientes:

- (a) *fijación espontánea*: aporta menos del 10% del nitrógeno total y ocurre por la actividad natural de descargas eléctricas sobre el nitrógeno atmosférico.
- (b) *fijación biológica*: contribuye globalmente con más de 70 millones de Tn por año, cerca de la mitad del nitrógeno utilizado en el cultivo de plantas (Peoples y col., 1995).
- (c) *fijación industrial*: representada por los fertilizantes nitrogenados, que aporta, en comparación con la fijación biológica, cantidades casi equivalentes de nitrógeno anual fijado.

Conjuntamente con el marcado incremento de las prácticas agrícolas en las últimas décadas, se ha observado un uso abusivo de fertilizantes nitrogenados de origen químico. De este modo, los beneficios obtenidos debido al mayor rendimiento de los cultivos han sido contrarrestados por el impacto negativo que estos fertilizantes provocaron sobre el medio ambiente:

eutroficación de los cursos de agua, contaminación de las napas freáticas, así como contaminación atmosférica generada por la actividad de las bacterias del suelo sobre los nitratos (Vitousek y col., 1997).

En los últimos años se ha puesto énfasis en un nuevo concepto en la agricultura: la *sustentabilidad*. Un sistema agrícola es sustentable cuando perdura en el tiempo manteniendo o incrementando su productividad, sin que ello implique deteriorar el ambiente. De este modo, la sustentabilidad incorpora como propósito la conservación de los recursos que están involucrados en la producción.

Entre las leguminosas de interés agronómico se destacan para la producción de granos los cultivos de soja, poroto, arveja y maní, entre otros, y las forrajeras alfalfa y trébol. Estas plantas se caracterizan por presentar altos contenidos de nitrógeno tanto en materia verde como en granos, lo que podría guardar relación con su capacidad para desarrollar nódulos fijadores de N en simbiosis con rizobios. El cultivo de leguminosas en rotación con no leguminosas permite alcanzar una fijación de 1 a 2 Kg de N ha⁻¹ día⁻¹ de estación de cultivo y, con ello, un ahorro de 200-300 millones de dólares por la menor utilización de inoculantes. Paralelamente, la selección de cepas más eficaces, asociadas al uso de inoculantes de buena calidad, puede optimizar la contribución de la fijación biológica del nitrógeno en dichos cultivos (Peoples y Craswell, 1992).

2. SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA: LA SITUACIÓN ACTUAL EN LOS SUELOS DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA.

Los suelos de la provincia de Córdoba han sufrido, en las últimas décadas, una intensificación de prácticas agrícolas con una marcada explotación de los recursos naturales de los mismos. Por ello, a comienzos del siglo XX se produce un fuerte desplazamiento del cultivo de maní hacia el sur y otras regiones de la provincia. La pérdida de productividad de las tierras debido a la degradación físico-química y biológica de los suelos, la erosión hídrica y eólica, entre otras causas, contribuyeron con este desplazamiento. A ello se

suma el marcado incremento del monocultivo de soja que tuvo gran incidencia en esta región, ya que reemplazó a cultivos de alta producción de materia seca como sorgo y maíz. La falta de fertilización balanceada, los bajos niveles de reposición de nutrientes del suelo, conjuntamente con la pérdida de materia orgánica, han conducido a una disminución considerable de la fertilidad de los suelos y por lo tanto, de la sustentabilidad de las explotaciones agrícolas.

Es conocido que sólo una parte de lo aplicado por los fertilizantes nitrogenados es aprovechado por el cultivo. En suelos pobres en N, como los que actualmente son de uso agrícola en nuestra región, el aporte de la FBN se hace extremadamente relevante.

La optimización de la FBN en leguminosas está en estrecha relación con la eficiencia y competitividad de la cepa rizobiana inoculada. De allí que cobren relevancia las propiedades de los rizobios que se utilizan como inoculantes. Efectivamente, Michelena y col. (1996) demostraron que la inoculación en maní con la cepa apropiada de rizobio produjo un mayor rendimiento de frutos, con un alto contenido de proteínas. Resultados similares fueron obtenidos en la zona manisera de la región centro-sur de la Provincia de Córdoba (Cholaky y col., 1983). Nava Juárez y col. (1997) encontraron que la inoculación de maní con *Bradyrhizobium* (CPB 07) aumentó el peso seco de los nódulos y parte aérea respecto del testigo sin inocular y del tratamiento fertilizado con sulfato de amonio.

De acuerdo a lo expuesto en párrafos anteriores, una eficaz alternativa para mejorar el rendimiento de las cosechas de leguminosas, consiste en implementar inoculaciones con rizobios capaces de establecer simbiosis efectivas con estas plantas. Ello conduciría además, a un reemplazo parcial de los fertilizantes nitrogenados aplicados a los cultivos, disminuyendo el peligro de desequilibrios medioambientales y reduciendo los costos para productores agropecuarios.

3. COMPETENCIA RIZOBIANA EN LA OCUPANCIA DE LOS NÓDULOS.

Un importante problema en ecología rizobiana es que las cepas de los inoculantes comerciales aplicados a cultivos de leguminosas son, en muchos casos, menos competitivas que los rizobios del suelo en la ocupancia de nódulos. En general, algunas cepas rizobianas son capaces de incrementar los parámetros simbióticos y agronómicos en condiciones controladas de laboratorio, pero fallan en condiciones de campo, generalmente debido a que el suelo es un ambiente competitivo que puede limitar la nodulación de la cepa inoculada (Thies y col., 1992; Toro, 1996).

Recién a partir de 1920, los investigadores tomaron conocimiento de la presencia de especies rizobianas indígenas en el suelo (Baldwin y Fred, 1929; Dunham y Baldwin, 1931). A pesar de que generalmente resulten poco eficientes en la fijación biológica de nitrógeno (FBN), estas poblaciones se encuentran mejor adaptadas, son más persistentes, altamente infectivas, mostrando mayor habilidad para ocupar los nódulos de las leguminosas (Triplett y Sadowsky, 1992; Streeter, 1994; Toro, 1996). No obstante, algunos autores consideran que cuando en el suelo existe un número variable de especies de rizobios que compiten por la nodulación, las leguminosas pueden activamente seleccionar a sus microsimbiontes. Cregan y col. (1989) demostraron que la acción combinada de los genes de las plantas huéspedes y de las bacterias controlaría de manera significativa, el resultado de la interacción simbiótica entre los dos miembros.

Entre los numerosos factores (figura II-1) que influyen no sólo en la supervivencia sino también en la competitividad de los rizobios, se pueden mencionar:

- Factores biológicos: presencia de bacterias epífitas, bacteriófagos (Handelsman, 1985) y de rizobios indígenas o naturalizados que desplazan a las cepas inoculadas (Gibson y col., 1976; Streeter, 1994; Evans y col., 2004).

- Factores abióticos: pH, acidez, salinidad extrema, altos contenidos de nitratos, textura del suelo, etc (Beattie y col., 1989; Slattery y col., 2001).
- Factores ecológicos: control biológico de las enfermedades en las plantas y presencia de herbicidas en el suelo (Triplet y Sadowsky, 1992; Koopman y col., 1995), prácticas agrícolas agresivas, rotación de cultivos con plantas no-leguminosas que afectan las poblaciones de rizobios (Coventry y Hirth, 1992; Riffkin y col., 1996), etc.

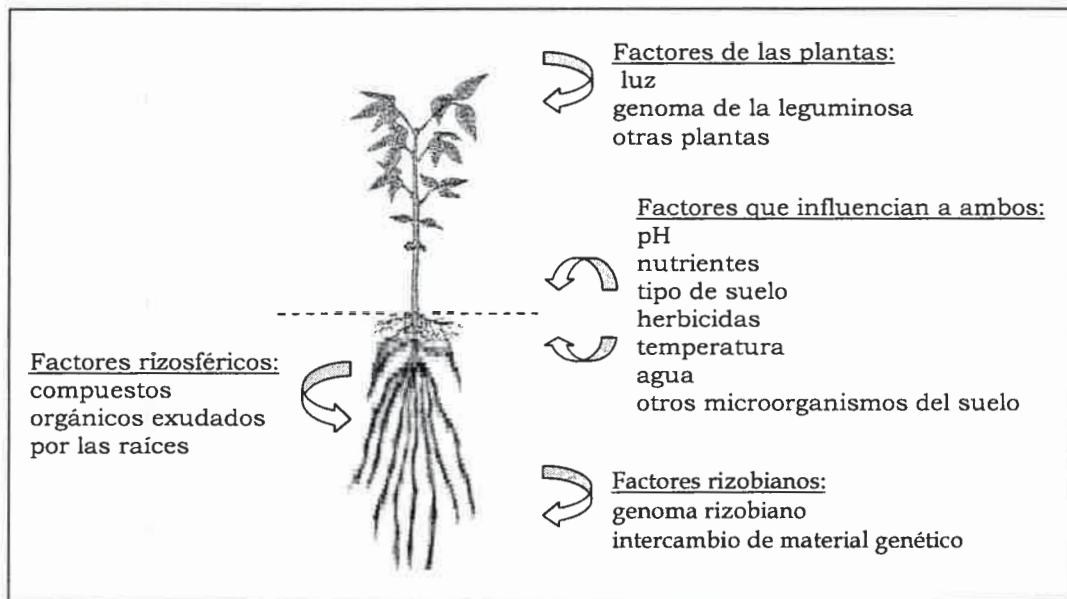


Figura II-1. Factores que determinan la competencia entre las distintas cepas de rizobios para la ocupancia de nódulos.

Paralelamente, debido a que la competitividad y eficiencia simbiótica son características no relacionadas entre sí (Amarger, 1981; Castro y col., 2000), las cepas inoculadas deben no sólo ser altamente competitivas sino también efectivas en la fijación de nitrógeno. En los últimos años, se han desarrollado diferentes estrategias para la obtención de cepas rizobianas más eficientes en la FBN tales como construcción de un híbrido del gen *nodD* que no requiere de flavonoides para la expresión de los genes *nod* en *Rhizobium* (Spaink y col., 1989), sobreexpresión de los genes *nifA* y *dctA* en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*

que permiten incrementar la FBN en sus plantas hospedadoras (Ronson y col., 1990) y selección de una cepa ácido-tolerante de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que muestra un incremento en la fijación de nitrógeno respecto de la cepa silvestre (Chen y col., 1991). Sin embargo, no se realizaron ensayos de competitividad con dichas cepas.

A pesar de los numerosos esfuerzos, y debido a la gran complejidad del “problema de la competencia” (Sadowsky y Graham, 1998), éste no ha sido aún resuelto. El escaso o nulo incremento en el rendimiento de cultivos de leguminosas inoculados que se desarrollan en suelos con alto número de rizobios nativos, estimula a los agricultores a abandonar la práctica de inoculación y reemplazarla por la aplicación de fertilizantes químicos, más costosas y riesgosas para el ambiente.

Determinantes genéticos y moleculares que influyen en la competencia por la nodulación.

Existen diversos determinantes genéticos que le confieren a una cepa rizobiana mayores ventajas competitivas para la nodulación:

1- *La habilidad de algunos rizobios para catabolizar compuestos como el mio-inositol*, presente en abundantes cantidades tanto en el suelo como en la rizósfera, resultaría esencial para una eficiente nodulación (Fry y col., 2001). Ello se relacionaría con la capacidad de algunas cepas de *R. leguminosarum* y *S. meliloti* de producir y catabolizar *rizopinas* (compuestos derivados de mio-inositol) durante la invasión de las leguminosas (Murphy y col., 1995; Wexler y col., 1995). Posiblemente estas moléculas constituyan el único sustrato disponible dentro de los hilos de infección, y por lo tanto su degradación resulte esencial para el crecimiento y multiplicación de las bacterias.

2- *La producción de trifolíttoxina (TFX)* por algunas cepas de *R. leguminosarum*, un potente péptido que inhibe el crecimiento de microorganismos de la subdivisión α -*Proteobacteria* (Tripplet y col., 1994) estaría directamente relacionada con la habilidad de estas cepas para ocupar

un número significativamente mayor de nódulos respecto de cepas no productoras (Robleto y col., 1997; 1998).

3- *La fisiología de la superficie celular rizobiana.* Se ha demostrado que mutantes transposicionales de *S. meliloti*, *R. tropici*, *R. etli* y *B. japonicum* deficientes en la producción de LPSs y EPSs poseen una capacidad competitiva severamente disminuida lo que se refleja en una menor ocupancia de nódulos respecto a las cepas salvajes (Lagares y col., 1992; Parniske y col., 1993).

4- *La presencia de genes específicos para la degradación de un sustrato selectivo* otorgaría a los rizobios mayores ventajas para la ocupancia de nódulos. Sólo las cepas rizobianas capaces de degradar mimosina, una toxina producida por plantas de *Leucaena*, tendrán más posibilidades de ocupar una alta proporción de nódulos en esta leguminosa (Soedarjo y Borthakur, 1998). En *R. leguminosarum* bv *trifolii* la expresión de los genes involucrados en la utilización de ramnosa es inducida por los exudados radicales de la planta huésped, sugiriendo que el catabolismo de este azúcar jugaría un importante rol tanto en la competitividad como en la interacción temprana entre los simbioses (Oreznik y col., 1998).

De este modo, los investigadores cuentan con importantes herramientas para "manipular" la competición entre los rizobios. Mediante técnicas de ingeniería genética, sería posible construir plásmidos portadores de genes específicos para ser introducidos en la cepa rizobiana de interés. Ello le conferiría ventajas adicionales frente a otros rizobios del suelo y favorecería su competitividad para la nodulación.



OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO.

De acuerdo a lo expuesto en párrafos anteriores, una eficaz alternativa para mejorar el rendimiento de las cosechas de leguminosas, consiste en aplicar inoculantes desarrollados a partir de microorganismos nativos, adaptados a las condiciones edafocológicas de la región, y capaces de establecer simbiosis efectivas con estas plantas. Esto permitiría además, reducir o eliminar la necesidad de aplicar fertilizantes nitrogenados al suelo disminuyendo el peligro de contaminación medioambiental.

Objetivo General.

- *Seleccionar cepas nativas provenientes de suelos del área manisera de Córdoba, eficientes en la FBN en maní y tolerantes a condiciones ambientales adversas, para la utilización como inoculantes.*

Objetivos Específicos.

- *Estudiar la competitividad de dicho aislamiento nativo frente a cepas de colección recomendadas como inoculantes de maní.*
- *Evaluar el comportamiento simbiótico de dicho aislamiento frente a poblaciones rizobianas naturalizadas presentes en diferentes suelos de la provincia de Córdoba.*

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Cepas rizobianas y plantas utilizadas.

1.1. Rizobios. NCHA22: aislamiento nativo nodulante de maní obtenido a partir de suelo proveniente de la localidad de Charras (Córdoba). Rizobio de velocidad de crecimiento: rápido; tiempo de generación: 4h (Taurian y col., 2002).

Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144: cepa recomendada como inoculante de maní (MIRCEN, Brasil). Tiempo de generación: 14h

Otras características fenotípicas, así como las genotípicas y simbióticas de ambas cepas se detallan en el anexo.

1.2. Plantas. *Arachis hypogaea* L. (maní) *Runner* cv *Tegua* INTA y cv ASEM 485. Las semillas fueron gentilmente provistas por el Ing. Soave, Criadero El Carmen (Gral. Cabrera, Córdoba).

2. Métodos de conservación de cepas bacterianas.

La conservación de las cepas bacterianas se realizó por congelación rápida de cultivos en fase logarítmica tardía suplementados con glicerol estéril en una concentración final del 20% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C .

3. Medios de cultivo para los rizobios.

Se utilizó el medio extracto de levadura-manitol (YEM) (Vincent, 1970). Se compone de: extracto de levadura 0.4 g.l⁻¹, manitol 10 g.l⁻¹, NaCl 0.1 g.l⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0.2 g.l⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 g.l⁻¹. El medio agarizado (YEMA) se preparó

adicionando agar-agar 1.5% (p/v) y rojo congo 0.25% (p/v). La esterilización se realizó durante 20 min a 121°C en autoclave.

4. Determinación de la resistencia a antibióticos.

Se evaluó en placas de medio YEMA la resistencia natural a diferentes antibióticos del aislamiento nativo NCHA22 y de la cepa recomendada como inoculante *Bradyrhizobium sp* SEMIA 6144.

Los antibióticos requeridos fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas 1000 veces respecto de la concentración final de los mismos en el medio que corresponda. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.2 μm de tamaño de poro. Las concentraciones de antibióticos ensayadas fueron:

Streptomicina (Sm): 25, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Spectinomicina (Sp): 20, 25, 40, 50, 100, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Kanamicina (Km): 20, 50 y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 h para NCHA22 y 6-7 días para *Bradyrhizobium sp* SEMIA 6144. Además se incluyeron placas controles sin antibiótico de ambas cepas.

5. Esterilización de las semillas de maní.

Las semillas de maní (limpias, sanas y de tamaño uniforme) fueron esterilizadas superficialmente con etanol 95% durante 30 seg y luego sumergidas 15 min en H_2O_2 15%. Finalmente se realizaron 5 – 6 lavados con H_2O destilada estéril (Somasegaran y Hoben, 1985). Las semillas se pregerminaron en oscuridad a 30°C en placas de Petri conteniendo algodón humedecido con agua destilada estéril, hasta que la radícula alcanzó una longitud de 2 cm.

6. Condiciones de cultivo de las plantas de maní.

Las semillas pregerminadas fueron transferidas a macetas conteniendo vermiculita estéril y llevadas a cámara de crecimiento con fotoperíodo de 18/6 h (luz/oscuridad), temperatura de 26/19°C (día / noche) y 50% de humedad relativa. Las plantas fueron regadas regularmente con H₂O corriente estéril y medio Hoagland sin nitrógeno (Hoagland y Arnon, 1950).

7. Ensayos de competencia para la nodulación.

Se utilizaron macetas plásticas conteniendo como soporte inerte vermiculita estéril. Las semillas fueron co-inoculadas con cultivos de las cepas NCHA22 y *Bradyrhizobium sp* SEMIA 6144, en una proporción 1:1. Se inoculó un volumen de 3 ml de cada cultivo bacteriano conteniendo aproximadamente 10⁵ ufc ml⁻¹. Inmediatamente se realizó la siembra de las semillas de maní pregerminadas (1 semilla por maceta). Como controles se incluyeron macetas con semillas sin inocular y macetas con semillas inoculadas con cada uno de los cultivos. Las plantas se mantuvieron en invernáculo durante 60 días.

8. Determinación de la ocupancia de nódulos.

Los nódulos fueron extraídos de las raíces de las plantas inoculadas y esterilizados superficialmente con etanol 95% durante 30 seg y con HgCl₂ al 0.1% durante 3 min, realizándose finalmente 4 - 5 lavados con H₂O destilada estéril (Vincent, 1970). Cada nódulo se maceró en 20 µl de H₂O destilada estéril en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Diez µl de esta suspensión fueron sembrados por duplicado en placas de Petri con medio YEMA y cicloheximida (50 µg ml⁻¹), con y sin el antibiótico Sm (200 µg ml⁻¹). Las placas fueron incubadas en estufa a 28°C hasta la aparición de colonias. Se identificó la cepa ocupante en cada nódulo en función de su capacidad de crecer en placas con o sin la adición del antibiótico.

Para corroborar que las colonias obtenidas a partir de los nódulos se correspondían con la cepa inoculada se realizó un ERIC-Fingerprint genómico.

9. Obtención del templado de ADN.

El templado de ADN se obtuvo a partir de dos o tres colonias bacterianas resuspendidas en 300 μ l de NaCl 1M, las que se agitaron vigorosamente durante 1-2 min, y se centrifugaron 4 min a 14.000 rpm. El pellet se resuspendió en 300 μ l de agua bidestilada estéril y se centrifugó en las mismas condiciones anteriormente descritas. Finalmente se adicionaron 200 μ l de resina CHELEX al 6 %, y se calentó 20 min a 56°C y 8 min a 99°C. El templado obtenido de esta forma se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización (Walsh y col., 1991).

10. Eric-Fingerprint genómico de las cepas aisladas de nódulos.

Se realizó ERIC-PCR fingerprint utilizando ADN genómico de las colonias obtenidas a partir del aislamiento de nódulos, para confirmar que éstas poseen un perfil genético idéntico al de las cepas inoculadas y descartar la presencia de cepas contaminantes. Para la amplificación se emplearon los primers E₁ (5' ATGTTAGCTCCTGGGGATTCAC3') y E₂ (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'). El volumen de reacción fue de 15 μ l y contenía 0.308 μ M de cada primer, 0.2 μ M de deoxinucleótidos, 3.6 μ l de ADN molde (5 ng μ l⁻¹), 0.55 U de Taq polimerasa.

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo con el siguiente ciclo de temperaturas:

95°C	1 min	}	35 ciclos
94°C	1 min		
52°C	1 min		
65°C	8 min		

68°C 16 min

Los productos de amplificación, en alícuotas de 5 μ l, fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.2% conteniendo TBE 0.5X y Bromuro de Etidio, y visualizados en transiluminador de luz UV.

11. Ensayos en microcosmos.

En este experimento se evaluó la competitividad para la ocupancia de nódulos de NCHA22 frente a rizobios naturalizados presentes en el suelo. Se utilizaron macetas plásticas de 15 x 35 cm conteniendo aproximadamente 4 kg de suelo no estéril, proveniente de la localidad de Pasco, Córdoba, con antecedentes de cultivo de maní.

Se colocaron 4 semillas de maní cv TEGUA pregerminadas por maceta. La inoculación en surco se realizó con un volumen de 2 ml (10^6 ufc semilla⁻¹) de un cultivo obtenido en medio YEM del aislamiento nativo NCHA22. Las mismas se trasladaron a cámaras de crecimiento y las plantas se cosecharon a los 50 días post-inoculación.

Las bacterias presentes en los nódulos fueron aisladas siguiendo la metodología descrita anteriormente (punto 7 de Materiales y Métodos, *Capítulo II*). Además, se evaluó el número de nódulos totales y el PSA.

12. Ensayos de inoculación a campo.

El presente ensayo se realizó en dos lotes comerciales de la firma Aceitera General Deheza ubicados en cercanías de las localidades de Olaeta y Santa Eufemia (Córdoba), en los que previamente se había cultivado maíz y soja. El inoculante en turba estéril utilizado (formulado por INTA Castelar, Bs. As) se obtuvo a partir del aislamiento NCHA22 el cual se cultivó en medio YEM a 28°C

durante 72 h en agitador rotatorio a 180 rpm. Se impregnó con este caldo turba estéril de Sphagnum hasta obtener un porcentaje de humedad final del 50%. El inoculante contó con una concentración final de 1×10^9 ufc g^{-1} de producto. Para la inoculación de semillas de maní *Runner* cv. ASEM 484 INTA se adicionó al inoculante en turba un protector comercial (laboratorios Biagro) a razón de 2.5 g por Kg de semilla inoculada. La concentración final del inoculante correspondió a 1×10^9 ufc semilla $^{-1}$.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con 2 tratamientos: 1- sin inocular; y 2- inoculado con NCHA22. La siembra se realizó el 11 de Noviembre de 2005. Los bloques se conformaron por 20 hileras (Olaeta) y 16 hileras (Santa Eufemia), separadas a 0,70 m entre sí. El largo de los mismos correspondió a 1000 m (Olaeta) y 1500 m (Santa Eufemia) y se sembraron con una densidad de 22 semillas. m^{-1} .

A los 45 días de efectuada la siembra, se recogieron al azar de 10 a 15 plantas de las parcelas sin inocular e inoculada con NCHA22 y se analizó número de nódulos totales, número de nódulos en raíz principal, número de nódulos en raíces laterales y PSA de las plantas. A los 90 días de efectuada la siembra se recolectaron nuevamente plantas contenidas a lo largo de una superficie de 0.70 m^2 de suelo, a partir de zonas distantes en cada uno de los tratamientos y se determinó número de nódulos, PSA incluidas las cajas y contenido de N.

13. Determinación del número más probable (NMP) en muestras de suelo.

La técnica del NMP permite estimar el tamaño de poblaciones rizobianas capaces de nodular una leguminosa determinada (Vincent, 1970).

Para esta determinación, 100 g de la muestra de suelo se resuspendió en 900 ml de agua estéril y se mantuvo en agitación (180 rpm) durante 5 min. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas 1:10 por cuadruplicado y se inocularon plántulas de maní con 2 ml de cada dilución. Las plantas se mantuvieron en invernáculo, se regaron periódicamente con agua estéril y luego

de 30 días se cosecharon para determinar la presencia o ausencia de nódulos. Los datos se analizaron según Somasegaran y Hoben (1985).

14. Análisis estadístico.

Se utilizó un diseño enteramente al azar. Se realizó un análisis de la varianza y las medias se contrastaron con el Test "t" de Student, con un nivel de significancia del 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Nuestro grupo de trabajo ha obtenido una colección de microsimbiontes de maní representativa de los diferentes Departamentos del área manisera de la provincia de Córdoba. La caracterización fenotípica (velocidad de crecimiento, tolerancia a condiciones adversas, eficiencia simbiótica) y genotípica (REP-PCR, ERIC-PCR, ARDRA y secuencia del gen *16S ARNr*) reveló que dicha población es heterogénea y que, sorprendentemente, no sólo incluye a los ya descritos rizobios de crecimiento lento (Género *Bradyrhizobium*) sino también a rizobios de crecimiento rápido (Géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) (Taurian y col., 2002; 2005).

Para el desarrollo de los experimentos que se detallan a continuación se seleccionó al microsimbionte de crecimiento rápido NCHA22 por su alta eficiencia en la FBN en maní, su tolerancia a condiciones ambientales extremas y su capacidad de solubilizar fosfatos.

1. Competencia entre NCHA22 y la cepa recomendada como inoculante *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 en la formación de nódulos en maní.

Como se mencionó anteriormente, las características de mayor tolerancia a las condiciones ambientales adversas y velocidad de crecimiento rápido del aislamiento nativo NCHA22, altamente deseables para la formulación de un inoculante, condujo a evaluar su competitividad para la ocupancia de nódulos frente a una cepa de *Bradyrhizobium sp.* recomendada como inoculante de maní.

La sensibilidad de las bacterias a antibióticos es una propiedad que varía entre diferentes especies por lo que su evaluación constituye una herramienta útil no sólo en estudios taxonómicos (Graham, 1963) sino también de ecología rizobiana (Obaton, 1971).

Con el fin de identificar las cepas que se encontraban ocupando los nódulos en los ensayos de competitividad, se analizó la resistencia natural a antibióticos del aislamiento nativo NCHA22 y de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144.

El aislamiento nativo mostró una resistencia natural a Sp ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y a Sm ($300 \mu\text{g ml}^{-1}$) a diferencia de la cepa de crecimiento lento, que es sensible a los tres antibióticos ensayados (Tabla II-1).

Tabla II-1. Resistencia natural de NCHA22 y *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 a antibióticos.

Cepas	Antibióticos ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
	Streptomycina	Spectinomycina	Kanamycina
NCHA22	≤ 300	≤ 100	-
<i>B. sp</i> SEMIA6144	-	-	-

(-) indica ausencia de crecimiento

El antibiótico Streptomycina se une al ARNr inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas. Debido a que este antibiótico es comúnmente utilizado para estudios de competitividad, se seleccionó para la identificación del microsimbionte en los estudios de ocupancia de nódulos. En estos ensayos, ambos inóculos fueron aplicados ($3 \times 10^5 \text{ ufc semilla}^{-1}$) en macetas conteniendo vermiculita estéril y luego se plantaron las semillas de maní pregerminadas, según se muestra en la figura II-2. Se incluyeron además, plantas controles inoculadas sólo con NCHA22 o con *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144.

A partir de 2 repeticiones se recolectaron 208 nódulos que se procesaron en forma individual. El contenido de cada uno de ellos se sembró en placas de medio YEMA con o sin la adición de Sm, para la determinación de las cepas ocupantes.

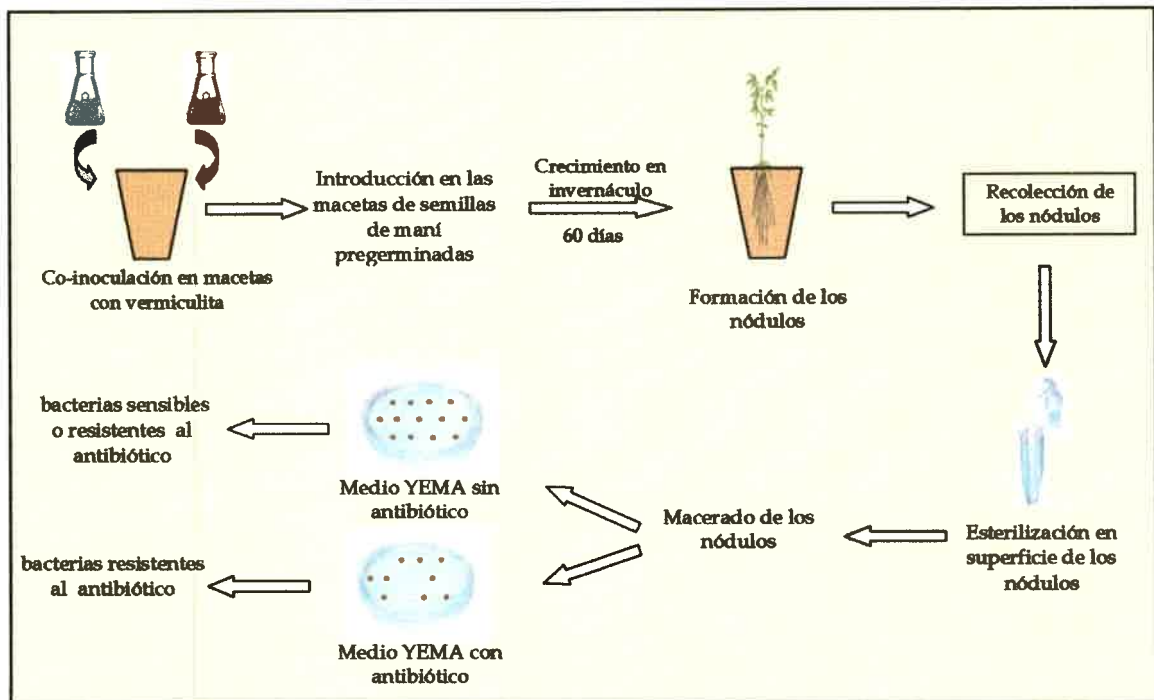


Figura II-2. Ensayo de competencia para la nodulación entre *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 y NCHA22 (Sm^R).

El 100% de las colonias obtenidas a partir de los nódulos provenientes de plantas controles inoculadas sólo con NCHA22 o con *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 crecieron en placas de medio YEMA suplementadas con el antibiótico Sm ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) o presentaron un idéntico perfil de ERIC-fingerprint genómico, respectivamente. Estos resultados demuestran que las cepas ocupantes de los nódulos se correspondían con las cepas inoculadas. No se observaron nódulos en plantas controles sin inocular.

El análisis de los datos obtenidos demostró que el aislamiento NCHA22 ocupó el 69% de los nódulos analizados, siendo este valor significativamente superior al obtenido con la cepa coinoculada *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 (figura II-3).

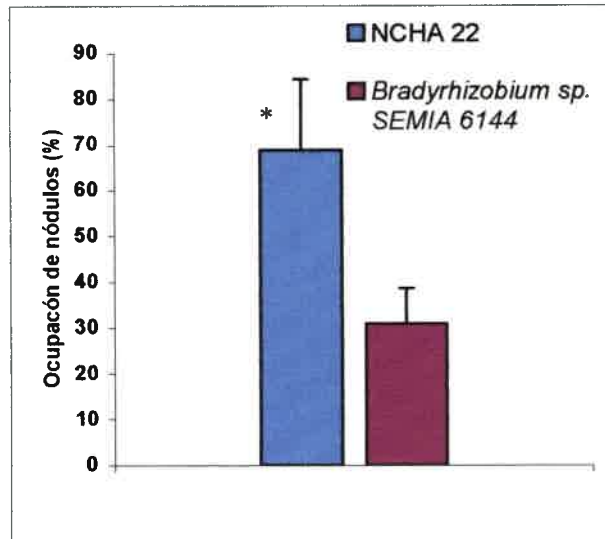


Figura II-3. Porcentaje de ocupación de nódulos del aislamiento NCHA22 y de la cepa *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144. (*) $p < 0.05$.

Todas las colonias obtenidas a partir de los nódulos ocupados por NCHA22 o por *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 mostraron un perfil de ERIC-fingerprint idéntico al obtenido a partir del ADN genómico de dichas cepas (figuras II-4 y II-5), lo que demuestra la ausencia de contaminación exógena en este ensayo.

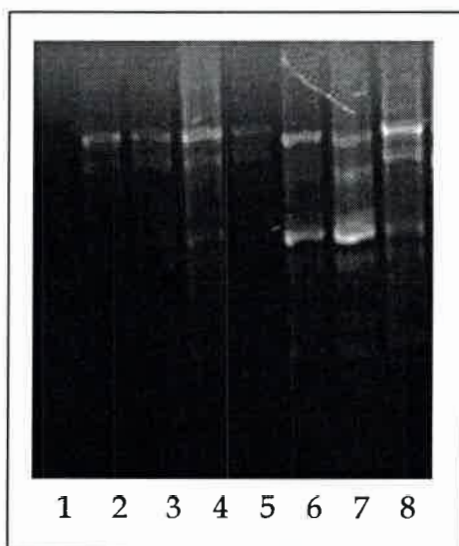


Figura II-4. ERIC-PCR de los aislamientos de nódulos ocupados por NCHA22. Calles: (1) control negativo; (2-7) aislamientos de nódulos; (8) control positivo (NCHA22)

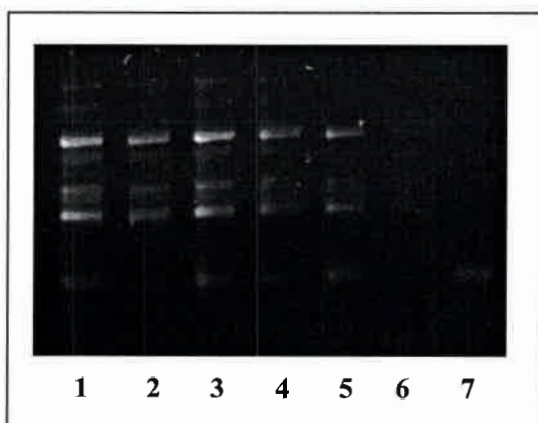


Figura II-5. ERIC-PCR de los aislamientos de nódulos ocupados por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Calles: (1) control positivo; (2-6) aislamientos de nódulos; (7) control negativo.

Uno de los requisitos importantes para la utilización de una cepa rizobiana como inoculante es la alta eficiencia en la FBN. Sin embargo, es también relevante analizar otras propiedades que puedan conferirle una ventaja adicional para su transferencia a campo, entre las que se encuentra su competitividad.

Los resultados obtenidos revelaron la habilidad de NCHA22 para ocupar un mayor número de nódulos en maní, cuando compite con la cepa recomendada como inoculante para este cultivo. Esta característica, conjuntamente con su alta eficiencia en la FBN y tolerancia a condiciones adversas, resultan altamente deseables para la selección del microsimbionte NCHA22 como posible cepa a utilizar en la elaboración de inoculantes de maní, en reemplazo de la recomendada por MIRCEN, *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144. Por otra parte, estos resultados apoyan la idea de la conveniencia de utilizar cepas que estén adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de la zona a inocular, en la formulación de inoculantes comerciales.

2. Competitividad de NCHA22 frente a otros rizobios naturalizados en ensayo en microcosmos.

Teniendo en consideración los resultados anteriores, se decidió evaluar la competitividad de NCHA22 frente a rizobios indígenas a partir de muestras de suelo no estéril, con historia previa de cultivo de maní, provenientes de la localidad de Pasco.

El análisis físico-químico de la muestra de suelo reveló las siguientes características:

Materia orgánica	%	1.79
Nitrógeno de nitratos	ppm	14.39
Nitratos	ppm	63.35
Humedad	%	10.68
pH		5.90

Se determinó, mediante la técnica del NMP, que la abundancia de rizobios indígenas nodulantes de maní en este suelo es de 8.5×10^3 rizobios g^{-1} de suelo. La inoculación en surco de las macetas se realizó con 2 ml de un cultivo de NCHA22 (10^6 ufc semilla $^{-1}$), como se detalla en Materiales y Métodos.

En este ensayo no se encontraron diferencias significativas en el número de nódulos totales y PSA entre las plantas controles sin inocular respecto de las plantas inoculadas con el aislamiento NCHA22 a los 50 días postinoculación (Tabla II-2).

Tabla II-2. Número de nódulos y PSA de plantas de maní cv TEGUA cultivadas en suelo no estéril e inoculadas con NCHA22.

Tratamiento	Nº de Nódulos planta $^{-1}$	PSA (g planta $^{-1}$)
Control sin inocular	31 ± 4	0.340 ± 0.030
Inoculadas con NCHA22	26 ± 3	0.222 ± 0.037

Los datos representan la media ± error estándar. n= 4-8.

Con respecto al número de nódulos ocupados por NCHA22, los valores obtenidos no fueron tan elevados como se hubiera deseado. Así, a partir del análisis de 38 nódulos provenientes de todas las plantas inoculadas se determinó que sólo un 35% de los mismos estaban ocupados por NCHA22. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el PSA entre los tratamientos.

La presencia de poblaciones rizobianas en el suelo que compiten para la ocupación de nódulos constituye una barrera importante para el establecimiento exitoso de la cepa introducida. Probablemente, entre las poblaciones rizobianas presentes en el suelo empleado en este ensayo existan genotipos más competitivos para ocupar los nódulos respecto de la cepa inoculada. Sin embargo, la ocupación de los nódulos por un genotipo rizobiano también se relaciona con su mayor abundancia en el suelo (Harimann y col., 1998; Velásquez y col., 1999). En este experimento, el número total de rizobios presentes en el suelo correspondió a 3.8×10^7 células maceta $^{-1}$ mientras que la concentración final de la cepa inoculada

correspondió a 8×10^6 bacterias maceta⁻¹. Es probable entonces que un incremento en la concentración de la cepa NCHA22 inoculada, permita mejorar el nivel de ocupancia en los nódulos. Otros autores demostraron la necesidad de aplicar inóculos de elevada densidad en los suelos a fin de incrementar la proporción de nódulos ocupados por la cepa introducida (McLoughlin y Dunicam, 1981; McLoughlin y col., 1984; Simon y col., 1996).

3. Comportamiento simbiótico de NCHA22 en ensayos a campo.

Dado que en el campo existen diversos factores que pueden afectar la efectividad de los rizobios inoculados (deseccación, temperatura, herbicidas, etc) los resultados obtenidos en el laboratorio, aún cuando constituyen un indicador de relevancia, no pueden extrapolarse directamente a condiciones de campo. Por ello, se decidió evaluar el comportamiento simbiótico de NCHA22 respecto de poblaciones naturalizadas en dos suelos maniseros de la provincia de Córdoba.

Los ensayos se realizaron en las localidades de Olaeta y Santa Eufemia (Córdoba) en suelos franco arenosos cuyas características físico-químicas revelaron:

	OLAETA	SANTA EUFEMIA
Materia orgánica (%)	2.60	3.94
Nitrógeno orgánico (%)	0.15	0.21
pH	6.1	6.0

La abundancia de rizobios nativos nodulantes de maní fue del orden de 1×10^3 rizobios g⁻¹ de suelo en la localidad de Olaeta y de 1×10^2 rizobios g⁻¹ de suelo en Santa Eufemia.

La siembra se realizó el 11 de noviembre de 2005 sobre rastrojo de soja y se utilizaron semillas de maní cv. ASEM 484 (INTA). La concentración final del inoculante (NCHA22) correspondió a 1×10^9 ufc semilla⁻¹.

A los 45 días posteriores a la siembra (momento en que las plantas se encontraban en el estadio fenológico R1) se recogieron al azar entre 10 a 15 plantas de los diferentes tratamientos y se evaluaron parámetros agronómicos y simbióticos como se detalla en la sección 9 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en ambos ensayos demuestran que la inoculación de las semillas produjo incrementos significativos en el número de nódulos formados tanto en la raíz principal como en las raíces laterales de plantas de maní (Tabla II-3 y Figura II-6). Dicho incremento en el número de nódulos totales correspondió a un 312% y 190% en las localidades de Olaeta y Santa Eufemia, respectivamente. Todos los nódulos formados presentaron en su interior la coloración rosa característica de nódulos fijadores de N.

Tabla II-3. Número de nódulos totales y distribución en la raíz de plantas de maní cv. ASEM 484 inoculadas con NCHA22 a los 45 días post-siembra.

Tratamientos	OLAETA			SANTA EUFEMIA		
	Nº nódulos Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíz Principal Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíces Laterales Planta ⁻¹	Nº nódulos Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíz Principal Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíces Laterales Planta ⁻¹
Control sin inocular	25 ± 8	6 ± 2	19 ± 7	10 ± 1	4 ± 1	6 ± 1
Inoculadas con NCHA22	103 ± 21*	22 ± 3*	81 ± 20*	29 ± 3*	9 ± 1*	20 ± 4*

Los datos representan la media ± el error estándar. n= 10 - 15 para la localidad de Olaeta y n=12 para la localidad de Santa Eufemia. (*) p< 0.05.

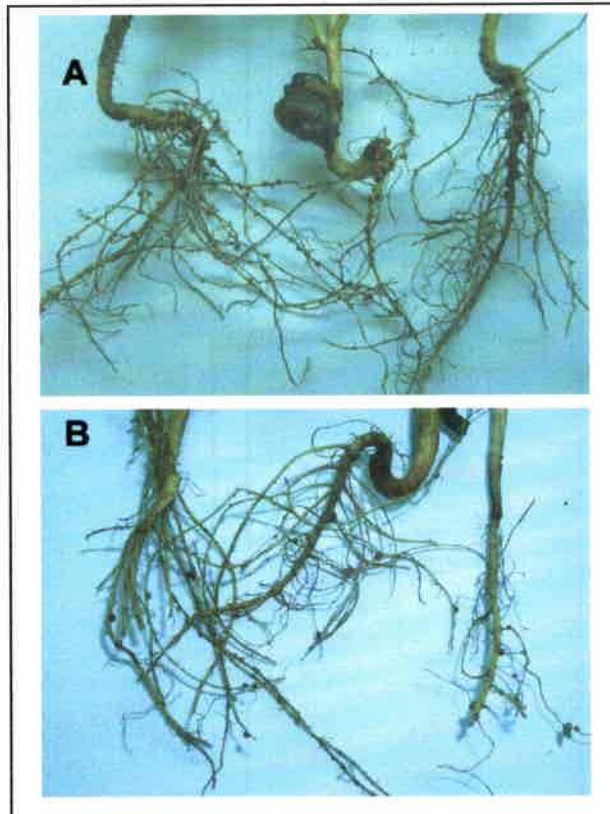


Figura II-6. Sistema radical de plantas de maní cv. ASEM 484. (A) inoculadas con NCHA22; (B) sin inocular.

A los 3 meses de efectuada la siembra (momento en que las plantas se encontraban en el estadio fenológico R6) se recogieron nuevamente plantas contenidas en una superficie de 0.70 m² de suelo para cada tratamiento y se determinó número de nódulos, PSA incluidas las cajas y contenido de N. En plantas inoculadas con NCHA22 provenientes de la localidad de Santa Eufemia se observó un aumento del 75% en el número de nódulos totales, atribuible especialmente a los formados en raíces laterales (Tabla II-4). El incremento en el número de nódulos observado en estas plantas no se correspondió con un aumento en el PSA y contenido de N (Tabla II-5).

Tabla II-4. Número de nódulos totales y distribución en la raíz de plantas de mani cv. ASEM 484 inoculadas con NCHA22 a los 90 días post-siembra.

Tratamientos	OLAETA			SANTA EUFEMIA		
	Nº nódulos Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíz Principal Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíces Laterales Planta ⁻¹	Nº nódulos Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíz Principal Planta ⁻¹	Nº nódulos en Raíces Laterales Planta ⁻¹
Control sin inocular	300 ± 64	56 ± 7	244 ± 66	49 ± 5	24 ± 4*	25 ± 5
Inoculadas con NCHA22	217 ± 57	43 ± 15	175 ± 59	86 ± 7*	12 ± 3	74 ± 3*

Los datos representan la media ± el error estándar. (n= 5). (*) p < 0.05.

Tabla II-5. Peso seco aéreo y contenido de N de plantas de mani cv. ASEM 484 inoculadas con NCHA22 a los 90 días post-siembra.

Tratamientos	OLAETA		SANTA EUFEMIA	
	PSA (% PF)	Contenido de N (mg g ⁻¹ PSA)	PSA (% PF)	Contenido de N (mg g ⁻¹ PSA)
Control sin inocular	20.70 ± 0.07	27.0 ± 0.5	21.82 ± 0.08	28.5 ± 0.5
Inoculadas con NCHA22	21.93 ± 0.81	22.5 ± 2.5	20.56 ± 0.07	28.5 ± 0.5

Los datos representan la media ± el error estándar. (n= 2) Cada valor se obtuvo a partir de un pool de 4-5 plantas. PF (peso fresco)

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) tiene gran importancia en la provincia de Córdoba y es utilizado como fuente de materia prima para las industrias aceiteras y de confitería.

Desde la década del '60, las diferentes estrategias de inoculación ensayadas en este cultivo por distintos grupos de investigación, han arrojado resultados contradictorios. En algunos casos no se reportaron incrementos en la producción de este cultivo (Giandana, 1971). En cambio, los resultados obtenidos por Cholaky y col. (1983) y Reddy y col. (1998), indicarían la posibilidad de incrementar los rendimientos de este cultivo y mejorar la calidad del fruto, especialmente cuando el inoculante ha sido formulado con cepas de rizobios de alta efectividad y capacidad competitiva.

Las plantas cosechadas tempranamente, contienen nódulos que se forman inmediatamente después de la inoculación. Consecuentemente, la ocupancia de estos nódulos depende principalmente de la competitividad intrínseca de las cepas, es decir de su capacidad para iniciar y sostener la infección más rápido y más eficientemente que las cepas competidoras (Vlassak y col., 1997). Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en Olaeta y Santa Eufemia, mostraron que a los 45 días de efectuada la siembra existe un marcado incremento en el número de nódulos totales de las plantas inoculadas con NCHA22 (Tabla II-4). Cabe considerar que estudios referidos a la dinámica de la FBN de maní indicaron que la actividad de la enzima nitrogenasa alcanza un máximo en plantas de 44 días de edad disminuyendo luego marcadamente (Ayala, 2003). Dado que en las plantas inoculadas con NCHA22 obtenidas a partir de ambos ensayos a campo a los 45 días post-siembra se observó un marcado incremento en el número de nódulos formados (Tabla II-4) es posible especular que el éxito de la inoculación con el aislamiento nativo NCHA22 se podría reflejar en un mayor rendimiento en granos y/o una mejor la calidad de semillas, al finalizar el ciclo del cultivo (estadío fenológico R8). En estadíos más tardíos del crecimiento de las plantas, la eficiencia en la formación de nódulos de la cepa inoculada es aún en parte, importante. Para inducir nódulos en etapas más

tardías, las cepas deben mantenerse y multiplicarse en la rizósfera del huésped en las condiciones ambientales prevaletentes, capacidad que se denomina competencia saprofítica (Dowling y Broughton, 1986; Vlassak y col., 1997). A los 90 días de efectuada la siembra el incremento en el número de nódulos formados en las plantas inoculadas con NCHA22 sólo se mantuvo para las plantas provenientes del ensayo efectuado en Santa Eufemia. Ello podría atribuirse a una reducción en la competencia saprofítica de NCHA22 en suelos de Olaeta, vinculada al mayor número de rizobios nativos presentes en este suelo como así también a las escasas precipitaciones ocurridas en el cultivo (232.2 mm).

Considerando que en los ensayos a campo la inoculación con NCHA22 produjo un aumento en el número de nódulos formados (aún cuando no se observaron cambios en el contenido de N), resultaría interesante analizar el efecto de la misma en el rendimiento y/o en la calidad de los frutos obtenidos en la cosecha de este cultivo. Sería también relevante el análisis, de la capacidad competitiva y persistencia de NCHA22 en un nuevo ensayo, en condiciones a campo.

CAPÍTULO III

**ROL DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA
SUPERFICIE CELULAR BACTERIANA
EN LA INTERACCIÓN MANÍ-RIZOBIO.**

INTRODUCCIÓN.

El establecimiento de la simbiosis comienza con el reconocimiento entre los rizobios y las leguminosas, mediante un intercambio de señales químicas en la rizósfera (sección 3.2, Capítulo I). Pero existe además, un segundo nivel de reconocimiento que se establece por el contacto físico entre la superficie externa bacteriana y las paredes celulares de las células vegetales, ambas constituidas por polisacáridos.

Los rizobios son bacterias Gram-negativas y por lo tanto, poseen una membrana externa de lipopolisacáridos (LPSs) que se encuentra rodeada por una cápsula de polisacáridos (CPSs). Pueden acumular β -glucanos cíclicos en el espacio periplásmico, y secretar abundantes cantidades de exopolisacáridos (EPSs) al medio extracelular. Estos cuatro tipos de polisacáridos de superficie, si bien difieren en su composición y estructura, contribuyen con la adaptación de las bacterias a las condiciones del suelo, promueven la invasión de los nódulos y protegen a los rizobios frente a los mecanismos de defensa desencadenados en las plantas (Eggleston y col, 1996).

1. Lipopolisacáridos (LPSs)

1.1. Localización celular y estructura química.

La arquitectura básica de los LPSs rizobianos consiste en una porción lipídica y otra glicosídica, y se corresponde a los encontrados en bacterias patógenas de la familia Enterobacteriaceae (Kannenberg y col., 1998). La región hidrofóbica, anclada a la membrana bacteriana, es conocida como lípido-A, mientras que la región glicosídica e hidrofílica, orientada hacia el exterior, puede ser estructuralmente subdividida en un núcleo de oligosacáridos (core) y un antígeno-O variable. Esta última región no sería requerida para la viabilidad celular ya que es posible obtener en el laboratorio mutantes que carezcan de este polisacárido. Dichas mutantes se caracterizan

porque sus colonias muestran un fenotipo “rugoso” a diferencia del fenotipo liso de la cepa silvestre.

A pesar de la similitud general en la arquitectura molecular de los LPSs, existen notables diferencias entre las distintas especies rizobianas y entéricas.

- *Lípido-A*: Es considerado una potente endotoxina tanto para las plantas como para los animales. Esta región posee una gran cantidad de ácidos grasos que permiten a los LPSs permanecer anclados a la membrana fosfolipídica externa. En general, consiste en unidades disacáridas de 2,3-diaminoglucosa o glucosamina unidas a la porción del núcleo de oligosacáridos a través de ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico (KDO). El azúcar reducido puede ser oxidado a amino gluconato o estar fosforilado en la posición C₁, mientras que el segundo residuo de glucosamina también puede estar fosforilado o presentar sustituciones de ácido galacturónico (Reuhs y col., 1995).

Como se observa en la figura III-1A, el lípido-A de *R. etli* consiste en un residuo trisacárido formado por ácido galacturónico (GalUA), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido 2-amino-2-deoxiglucónico (GlcNonato) (Bhat y col., 1994). Se ha demostrado que esta estructura química está muy conservada en *R. etli* y *R. leguminosarum* *bv. viciae* y *trifolii*, pero difiere en su composición de azúcares con el lípido-A de *S. meliloti*, *S. fredii*, *Bradyrhizobium* *spp.* y *E. coli* (Baht y col., 1991). Por otra parte, las cadenas de ácidos grasos hidroxiladas acopladas a los residuos de GlcNAc y GlcNonato muestran pocas variaciones en su estructura entre las diferentes especies de *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Baht y col., 1994; Brozek y col., 1996).

- *Núcleo de oligosacáridos (core)*: Consiste en una región glicosídica compleja, rica en KDO que se encuentra anclada al lípido-A y, dependiendo de la especie, puede estar unido a los polisacáridos que forman el antígeno-O (Fosberg y Carlson, 1998) (figura III-1B). Mediante estudios inmunológicos y moleculares Bhat y col. (1991) y Zhang y col. (1992) demostraron que los componentes presentes en esta región del LPS son idénticos en *R. leguminosarum* y *R. etli*.

▪ **Antígeno-O:** Este dominio consiste en una cadena de polisacáridos-O y se caracteriza por ser muy variable, tanto en su estructura como en su longitud entre especies y aún dentro de la misma especie, excepto en *S. meliloti* cuya composición de azúcares se encuentra altamente conservada (Reuhs y col., 1994; 1998). Se ha descrito la presencia de ácido urónico, heptosas o KDO en el Antígeno-O de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Wang y Hollingsworth, 1994), *R. tropici* CIAT899 (Gil-Serrano y col., 1995), y *M. huakuii* IFO15243T (Choma y col., 2000). Como se observa en la figura III-1C, el Antígeno-O de *R. etli* CE93 es un polímero de unidades trisacáridas repetidas, constituidas por ácido glucurónico, fucosa, y 3-O-metil-6-deoxytalosa (Fosberg y col., 2000).

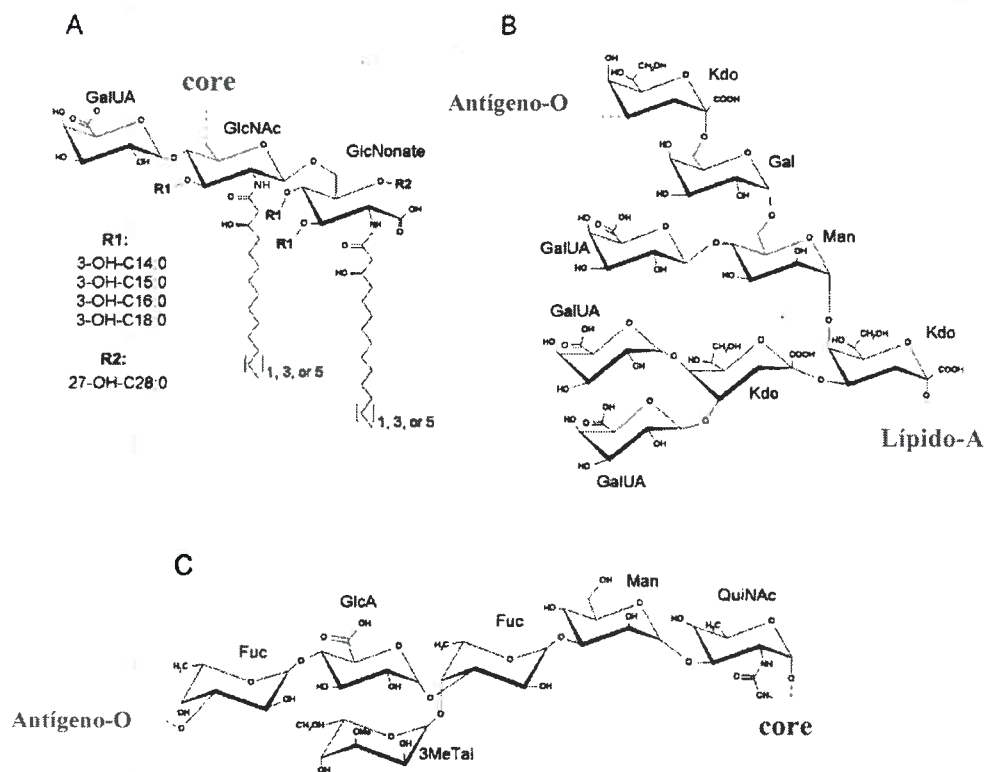


Figura III-1. Estructura química del lipopolisacárido de *R. etli* CE3. (A) Lípido-A; (B) Núcleo de oligosacáridos; (C) Antígeno-O. Abreviaturas: (GalUA) ácido galacturónico, (GlcNAc) N-acetil-glucosamina, (GlcNonate) ácido 2-amino-2-deoxiglucónico, (Kdo) ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico, (Gal) galactosa, (Man) manosa, (QuiNAc) 2-N-acetamida-2,6-dideoxiglucosa, (Fuc) fucosa, (3MeTal) 3-O-metil-6-deoxytalosa, (GlcA) glucosamina. Extraído de Laeremans y Vanderleyden, (1998).

1.2. Rol en la simbiosis.

Una de las dificultades que presenta el estudio del posible rol simbiótico de polisacáridos de la superficie rizobiana radica en que las vías biosintéticas de LPSs, EPSs y KPSs se encuentran interconectadas (Kereszt y col., 1998).

Hasta hace unos años se creyó que los LPSs rizobianos jugaban un rol importante durante las primeras etapas de reconocimiento en leguminosas que forman nódulos determinados (Kato y col., 1980). Sin embargo, mutantes LPS⁻ de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* fueron capaces de desarrollar nódulos e invadir parcialmente el tejido radical de plantas de trébol (Dazzo y col., 1991) por lo que actualmente se cree que estos polisacáridos no estarían específicamente involucrados en las etapas iniciales de la simbiosis (Spaink, 2000).

Un segundo nivel de percepción de los LPSs por la planta huésped ocurriría en etapas más tardías de la simbiosis, como son el crecimiento de los hilos de infección y la endocitosis de las bacterias. En estas etapas, los rizobios se encuentran aún más expuestos a las respuestas de defensa de sus huéspedes y por otra parte, las plantas posiblemente requieran de una nueva señal para permitir el progreso de la simbiosis. Los fenotipos simbióticos más severamente afectados fueron observados en mutantes LPS⁻ simbiotes de leguminosas que forman nódulos determinados (Kannenberg y col., 1998). Así, mutantes de *R. etli* carentes del antígeno-O (colonias rugosas) y deficientes en la producción de LPSs, desarrollaron pseudonódulos Fix⁻ y fueron incapaces de inducir la formación de hilos de infección persistentes en *P. vulgaris*. De este modo, las mutantes LPS⁻ permanecían dentro de los hilos de infección que abortaban en el momento de la penetración del nódulo (Noel y col., 2000). En *Sesbania rostrata*, las células del córtex radical mostraron síntomas de reacciones de defensa frente a mutantes de *Azorhizobium caulinodans* productoras de LPSs alterados. Sólo se observaron estructuras infectivas tipo nódulos y las bacterias permanecían en el interior de los hilos de infección (Gao y col., 2001).

En conjunto, estos antecedentes permitieron proponer tres posibles mecanismos de acción de los LPSs rizobianos en la simbiosis:

1- Estas moléculas podrían actuar como *inhibidores de las reacciones de defensa de las plantas*. En este sentido, el antígeno-O parece prevenir el inicio de estos mecanismos enmascarando el núcleo de oligosacáridos de los LPSs (Kannenberg y col., 1998) el que ha sido postulado como principal determinante de patogenicidad. Evidencias citológicas que permiten reafirmar esta hipótesis fueron aportadas por Perotto y col. (1994). Estos autores encontraron una mayor acumulación de matriz intercelular, paredes secundarias modificadas y muerte celular esporádica en plantas de *Vicia spp.*, causadas por las reacciones de defensa desencadenadas por una mutante LPS⁻ de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Curiosamente, una mutante *lpsB*⁻ de *S. meliloti* Rm2011 (deficiente en la biosíntesis del core del LPS) conservó su fenotipo Fix⁺ en plantas de *M. sativa* pero mostró un fenotipo Fix⁻ en la planta huésped *M. truncatula* (Lagares y col., 1992; 2001). Niehaus y col. (1998) observaron que en estas plantas los hilos de infección se encontraban rodeados por pared celular con estructuras similares a papilas y los nódulos presentaban autofluorescencia debido a la acumulación de compuestos fenólicos en el tejido central.

2- Posiblemente actuarían como *señal* participando en la inducción de la organogénesis de los nódulos. En este sentido, Dazzo y col. (1991) observaron que la preinoculación con bajas concentraciones de LPSs de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, promovió la formación de hilos de infección en el sitio de aplicación en raíces de plantas de trébol. Sin embargo, dicho efecto no se observó luego de adicionar LPSs de rizobios heterólogos como *R. leguminosarum* bv. *viciae* o *S. meliloti*.

3- Los LPSs podrían contribuir con *la adaptación de las bacterias en el interior de los nódulos*. Estudios físico-químicos de LPSs de *R. etli* CE3, cultivado en condiciones similares a las encontradas en el ambiente endosimbiótico (pH ácido y baja concentración de O₂), revelaron un aumento en la hidrofobicidad de estas moléculas (Kannenberg y Carlson, 2001).

2. Polisacáridos capsulares (KPSs)

2.1. Localización celular y estructura química.

La cápsula, también conocida como Antígeno-K, rodea a la bacteria y constituye una matriz hidratada que le confiere resistencia a bacteriofagos y a las condiciones de desecación comúnmente encontradas en el ambiente rizosférico.

Los polisacáridos capsulares fueron clasificados en dos grupos diferentes dependiendo de su estructura. El grupo I incluye a polisacáridos de alto peso molecular, que carecen del residuo de ácido fosfatídico que los ancla a la membrana celular externa y cuya síntesis en *E. coli* no es sensible a altas temperaturas. Los Antígenos-K que se incluyen en el grupo II son moléculas de bajo peso molecular, ricos en ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) o azúcares similares, contienen ácido salicílico, aminoácidos o grupos fosfatos como componentes ácidos, y permanecen anclados a la membrana celular externa a través de ácido fosfatídico (Rick y Silver, 1996).

A pesar de las notables diferencias en su estructura, ambos tipos de cápsulas fueron identificadas en miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Los Antígenos-K grupo II que actualmente se conocen, han sido identificados en especies de *Sinorhizobium* (Reuhs y col., 1993; Fosberg y Reuhs, 1997; Fosberg y Carlson., 1998; Kannenberg y col., 1998) y se denominan KPSs por poseer una estructura análoga a un subgrupo de antígenos K de *Escherichia coli* (Reuhs y col., 1993). De modo similar al Antígeno-O, la estructura de estos KPSs es muy variable y difiere no sólo entre distintas especies de microorganismos sino también entre las diferentes cepas de una especie (Fosberg y Reuhs, 1997). En *B. japonicum*, los polisacáridos capsulares poseen la misma estructura y composición que los exopolisacáridos (EPSs), siendo la localización celular la única diferencia entre ambos. Por otro lado, debido a que carecen de KDO, se denominan CPSs para diferenciarlos de las moléculas de KPSs descritas anteriormente.

Finalmente, los trabajos realizados por Reuhs y col., (1993 y 1995) permitieron concluir que (a) los antígenos K son específicos de cepa; (b) la producción de uno o más KPS depende de las condiciones de cultivo de las células y (c) debido a que se encuentran localizados directamente rodeando la membrana bacteriana y no son secretados al medio, su rol simbiótico se desarrollaría luego del primer contacto entre el simbiote microbiano y su huésped.

2.2. Rol en la simbiosis.

Actualmente resulta poco clara la función específica de los KPSs en la simbiosis y sólo ha sido estudiada en la interacción *S. meliloti*-alfalfa (*Medicago sativa*). Becquart-de Kozak y col. (1997) encontraron que mutantes de *S. meliloti* deficientes en KPSs indujeron una rápida acumulación de ARNm de la vía biosintética de flavonoides en las hojas de estas plantas. Los flavonoides son moléculas intermediarias de la biosíntesis de diferentes compuestos fenólicos, incluyendo a las fitoalexinas involucradas en el sistema de defensa de las plantas (Vickery y Vickery, 1981). Por ello se estima que los polisacáridos capsulares actuarían como componentes estructurales que permitirían a la bacteria suprimir las respuestas de defensa de las plantas.

3. **β -Glucanos cíclicos.**

3.1. Localización celular y estructura química.

Constituyen entre el 5-20 % del peso fresco total de la célula y se encuentran en todos los miembros del orden *Rhizobiales*. Estas moléculas se localizan en el periplasma donde aparecen como solutos osmóticamente predominantes, por lo que jugarían un rol clave tanto en la adaptación hipoosmótica de las bacterias (Breedveld y col., 1994) como en el proceso de infección en plantas (Franssen y col., 1992; Gray y col, 1990).

Se ha informado que en especies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*, los β -glucanos cíclicos contienen entre 17 a 25 residuos de glucosa unidos únicamente por enlaces glucosídicos (1-2) mientras que *Bradyrhizobium japonicum* produce pequeños oligómeros conteniendo entre 10 a 13 residuos de glucosa asociados mediante enlaces (1-3) y (1-6) (Stanfield y col. 1988) (figura III-2).

Los glucanos cíclicos (1-2) presentan cargas luego de la adición de sustituyentes aniónicos como *sn*-1 fosfoglicerol, ácido succínico y ácido metilmalónico (Batley y col., 1987; Breedveld y col., 1990). El sustituyente predominante en cepas de *A. tumefaciens* y *S. meliloti* es *sn*-1 fosfoglicerol derivado del fosfatidilglicerol y unido a la molécula de glucosa por enlaces fosfodiéster en la posición C-6. Aunque los glucanos cíclicos (1-3) (1-6) son predominantemente neutros, en *B. japonicum* se han identificado sustituyentes de fosforilcolina con enlaces (1-3) en la posición C-6 del residuo de glucosa (Rollin y col., 1992).

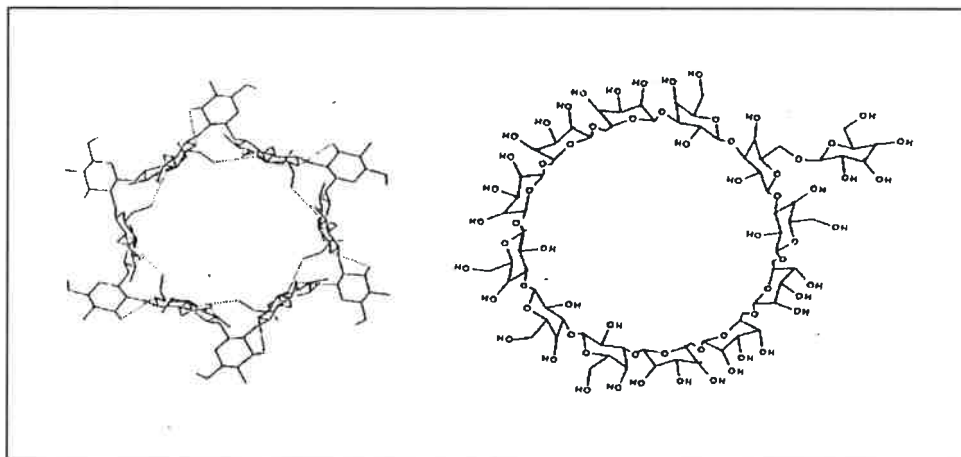


Figura III-2. Conformación de máxima simetría y mínima energía de una molécula de glucanos cíclicos (1-2) conteniendo 18 residuos de glucosa (izquierda); estructura propuesta para el residuo de glucano cíclico (1-3) (1-6) conteniendo 13 residuos de glucosas (derecha).

3.2. Genes involucrados en la biosíntesis de glucanos cíclicos.

Se ha descrito que *S. meliloti* posee dos loci cromosomales, denominados *ndvA* y *ndvB*, responsables de la biosíntesis y el transporte de estos polisacáridos bacterianos. Además, el locus *cgm* (cyclic glucan modification) codifica para la enzima fosfoglicerol transferasa responsable de añadir los sustituyentes de *sn-1* fosfoglicerol a estas moléculas (Wang y col., 1999). En *A. tumefaciens* los loci *chvA* y *chvB* son estructural y funcionalmente homólogos a los genes *ndvA* y *ndvB*, respectivamente (Breedveld y col., 1995; Cangelosi y col., 1989; Ielpi y col., 1990).

Los genes *ndvB/chvB* codifican una proteína de alto peso molecular (319 kDa) involucrada en la síntesis de glucanos cíclicos (1-2) a partir de UDP-glucosa (Geremia y col., 1987; Ielpi y col., 1990; Zorreguieta y col., 1988; Zorreguieta y col., 1985). Estudios realizados por Castro y col. (1996) proporcionan fuertes evidencias de que la actividad enzimática de la glicosiltransferasa codificada por dichos genes estaría asociada al inicio, elongación y ciclado de los residuos de glucanos cíclicos (1-2). La ausencia de secuencias de ADN homólogas a los genes *ndvB/chvB* en especies de *Bradyrhizobium* estaría vinculada con la incapacidad de estas bacterias de sintetizar glucanos cíclicos (1-2) (Bhagwat y col., 1992). En cambio, se ha identificado el locus adicional *ndvC*, que parece estar involucrado en la biosíntesis de los enlaces (1-6) del residuo de glucanos (Bhagwat y col., 1996).

Los genes *ndvA/chvA* codifican una proteína de 67 y 65 kDa, respectivamente. Estas proteínas comparten en un 76% su secuencia de aminoácidos y ambas poseen homología con proteínas del tipo ABC transportadores, como por ejemplo la proteína de membrana interna HlyB de *E. coli* involucrada en la exportación de la hemolisina A. De este modo, se ha propuesto que las proteínas NdvA y ChvA intervienen en el transporte de los glucanos cíclicos (1-2) al medio extracelular (Cangelosi y col., 1989; Stanfield y col., 1988). Sin embargo, una diferencia importante entre la secreción de la hemolisina A y los glucanos cíclicos (1-2) radica en que esta proteína es

secretada directamente del citoplasma al medio extracelular, mientras que la exportación de los glucanos cíclicos ocurre en dos etapas: primero, son liberados de la membrana citoplasmática al periplasma celular (donde se acumulan en altas concentraciones) y finalmente, son transportados desde el periplasma al medio extracelular.

3.3. Rol en la simbiosis.

Los glucanos cíclicos están involucrados en la adaptación hipoosmótica de las bacterias (Dickstein y col., 1988), proveyendo mecanismos para regular el volumen celular y el potencial osmótico y/o iónico del compartimiento periplásmico. Esta función es también importante para el establecimiento de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa debido a que estas bacterias deben atravesar zonas de distintas osmolaridades como la rizósfera, el hilo de infección y el nódulo (Breedveld y Miller, 1994).

Además de esta función, otros roles simbióticos pueden atribuirse a los glucanos cíclicos. Se ha observado que mutantes *chvA*⁻ y *chvB*⁻ de *A. tumefaciens* son avirulentas, incapaces de adherirse al mesófilo de hojas de *Zinnia sp.* y *Nicotiana tabacum* (Douglas y col., 1985) y no realizan una transformación oncogénica en dicotiledóneas. Paralelamente, mutantes *ndv* de *S. meliloti* muestran una capacidad severamente reducida para adherirse a raíces de alfalfa o forman nódulos vacíos e inefectivos (Dylan y col., 1986, 1990a; 1990b). En conjunto, estos antecedentes demuestran el rol clave de estas moléculas mediando la adhesión bacteriana a sitios específicos de la superficie de células vegetales.

Debido a que los anillos cíclicos de los glucanos son similares entre diferentes especies de microorganismos, resulta poco probable que estas moléculas confieran especificidad para la nodulación de leguminosas. Sin embargo, podrían actuar como señal inespecífica durante la formación de nódulos, ya que la adición exógena de concentraciones micromolares de glucanos cíclicos (1-2) incrementó el número y la cinética de formación de

nódulos en sistemas rizobio-leguminosa tales como *S. meliloti* – alfalfa (Dylan y col., 1990a) y *R. leguminosarum* *bv. trifolii* – trébol (Abe y col., 1982).

Se ha postulado que los glucanos cíclicos participan además, en la supresión de los mecanismos de defensa de la planta durante la infección (Bhagwat y col., 1999; Chen y col., 2003b). La característica cíclica de estos polisacáridos resultaría importante en dicha función ya que posiblemente permitiría que los rizobios sean más resistentes a la degradación por enzimas vegetales (Gray y col., 1992). Miller y col. (1994) detectaron acumulaciones significativas de gliceolina y daidzeina en hojas cotiledonares de soja cuando se aplicaron concentraciones micromolares de glucanos de *B. japonicum* USDA 110. La gliceolina actúa como fitoalexina constituyendo una barrera de defensa importante de la planta frente a microorganismos patógenos. La daidzeina es un potente inductor de los genes *nod* de *B. japonicum* (Kosslack y col., 1987) por lo que elevados niveles de este isoflavonoide llevarían a un incremento en la síntesis de los factores Nod por especies de *Bradyrhizobium*. Así, la inducción de la biosíntesis de estos flavonoides resultaría beneficiosa para el establecimiento de la simbiosis.

Finalmente, se ha comprobado que la deficiencia de las bacterias en la síntesis de glucanos cíclicos produce además, las siguientes alteraciones:

- (i) Disminución en el número de flagelos y pérdida de la movilidad (Cangelosi y col., 1990; Dylan y col., 1990a)
- (ii) Incremento en la sensibilidad a ciertos antibióticos (Cangelosi y col., 1990; Dylan y col., 1990a)
- (iii) Incremento en la producción de exopolisacáridos (Nagpal y col., 1992)
- (iv) Modificación en la composición de azúcares de superficie (Soto y col., 1992)

Estos efectos son aún más significativos en células cultivadas en condiciones de baja osmolaridad, y se revierten parcialmente en medios de elevada osmolaridad.

4. Exopolisacáridos (EPSs).

4.1. Localización celular y estructura química.

Los EPSs son moléculas que se acumulan en la membrana externa de la superficie bacteriana o bien son secretados al medio de cultivo. Consisten en heteropolímeros complejos de alto peso molecular con unidades repetidas de dos a nueve hexosas, siendo glucosa y galactosa los principales monómeros. Son de característica ácida por tener como sustituyentes ácidos urónicos u otros ácidos orgánicos.

En general, la composición de estas moléculas es constante dentro de una misma especie. Los polisacáridos producidos por todas las biovariedades de *R. leguminosarum* consisten en subunidades repetidas de 5 moléculas de glucosa, 2 moléculas de ácido glucurónico y 1 de galactosa con modificaciones de grupos acéticos, pirúvicos e hidroxibutanol (Figura III-3) (Hollingsworth y col., 1989). En los EPSs producidos por *Rhizobium sp.* NGR234 se han identificado grupos acéticos y pirúvicos (Djodverich y col., 1986) mientras que en *Bradyrhizobium elkanii* estas moléculas contienen únicamente ramnosa y ácido 4-O-metilgalacturónico (Puvanesarajah y col., 1987). Por su parte, *Rhizobium fredii* Tu6 sintetiza un polisacárido extracelular compuesto por unidades repetidas nonasacáridas constituidas por 7 moléculas de glucosa y 2 moléculas de galactosa. El segundo residuo de glucosa del extremo terminal posee un sustituyente de ácido pirúvico (Wei y col., 1996).

Se ha demostrado que la estructura de estos polisacáridos varía según las condiciones de cultivo así como de los diferentes estadios (vida libre o simbiótico) en que se encuentran los rizobios. Los EPSs de *Bradyrhizobium japonicum* son polímeros de unidades pentaméricas constituidas por manosa, glucosa y ácido galacturónico. En fase de crecimiento exponencial, la molécula de galactosa posee residuos O-acetilados, mientras que en fase estacionaria se encuentran grupos O-metildos (Dudman y col., 1983; Mort and Bauer., 1982). Además, la composición de los EPSs también varía en función de la fuente de carbono disponible. Cuando *B. japonicum* 2143 utiliza manitol o

gluconato (constituyentes comunes en los medios mínimos) los EPSs presentan la composición química antes mencionada, mientras que en presencia de malato (comúnmente encontrado en los nódulos y en los exudados radicales), la molécula de galactosa carece de las modificaciones indicadas (Karr y col., 2000). Por otra parte, Streeter y col. (1992) y Carlson y col., (1995b) demostraron que los EPSs producidos por *B. japonicum* en nódulos de plantas de soja, conocidos como polisacáridos nodulares (NPS), difieren de los secretados en condiciones de vida libre (descritos anteriormente). Estos NPSs se acumulan dentro de la membrana simbiosomal y contienen ramnosa, galactosa y ácido O-metil-glucurónico.

S. meliloti Rm1021, simbiote de alfalfa, es capaz de producir dos tipos de exopolisacáridos: el *succinoglicano* (EPS I) y el *galactoglucano* (EPS II). El primero de ellos es un polisacárido ácido compuesto por subunidades octasacáridas repetidas, con modificaciones pirúvicas, succínicas y acéticas. Estas subunidades, que consisten en unidades repetidas de 1 galactosa (Gal) y 7 glucosas (Glc), son polimerizadas resultando en un residuo tetrasacárido (-4Glc β -1.4Glc β -1.4Glc β -1.3Gal β -1) y una cadena lateral tetrasacárida (Glc β -1.3Glc β -1.3Glc β -1.6Glc β -1.6-). El galactoglucano (EPS II) es un polímero de subunidades disacáridas repetidas las cuales están formadas por glucosa acetilada conectada a un residuo de galactosa con sustituyentes pirúvicos (Figura III-3). Si bien se desconoce la razón por la cual *S. meliloti* Rm1021 produce ambos polisacáridos, se ha propuesto que la concentración de fosfato determinaría el tipo de EPS producido. Mendrygal y col. (2000) sugieren que bajos niveles de fosfato como los normalmente encontrados en el suelo (1 – 10 μ M), estimularían la síntesis del EPS II, mientras que altas concentraciones de fosfato, similares a las encontradas en el interior de los nódulos (20 – 100 mM), bloquearían la producción del galactoglucano e inducirían la síntesis del succinoglicano.

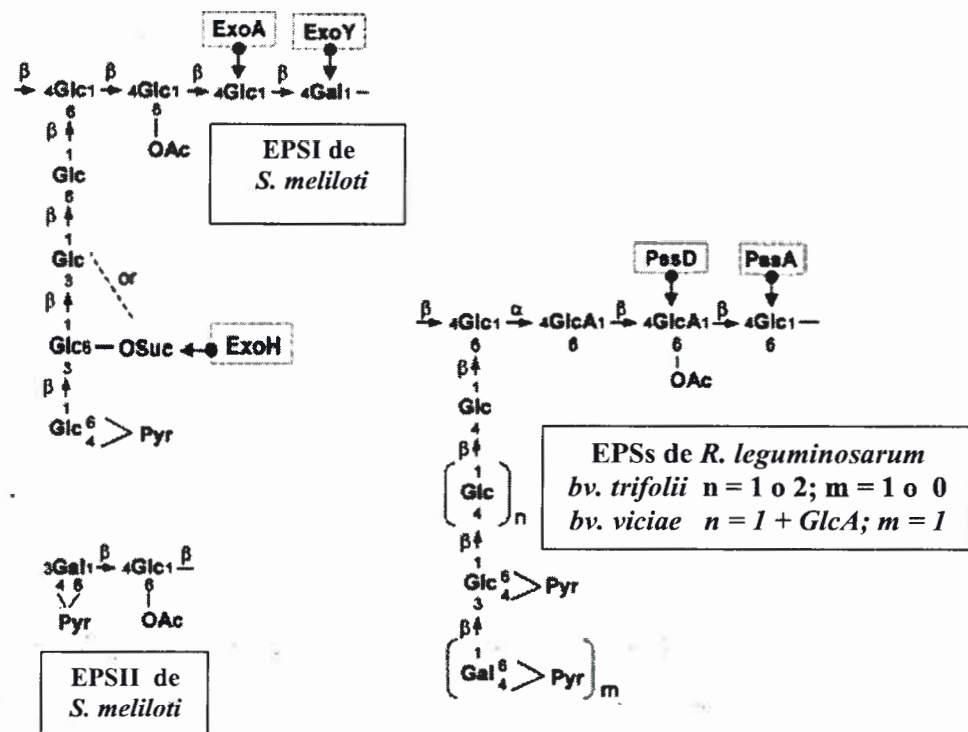


Figura III-3. Estructura química de las subunidades repetidas de los exopolisacáridos (EPSs) de *R. leguminosarum* (Robertsen y col., 1981; Dudman y col., 1983), EPS I y EPS II de *S. meliloti* Rm1021 (Aman y col., 1981; Her y col., 1990) Abreviaturas: Glc, glucosa; GlcA, ácido glucurónico; Gal, galactosa; OAc, ácido oxaloacético; Suc, succínico, Pyr, Ácido Pirúvico.

Estudios tendientes a dilucidar la composición estructural de los EPS I y EPS II en *S. meliloti*, demostraron la presencia de fracciones de diferente tamaño molecular. La fracción de alto peso molecular (HMW) consiste en varias unidades octasacáridas repetidas. La fracción de bajo peso molecular (LMW), comprende tres clases de oligosacáridos, denominados monómeros, dímeros y trímeros, siendo estos últimos la forma simbióticamente activa del succinoglicano (Wang y col., 1999).

Las primeras evidencias de la existencia de la forma LMW en los EPSs de *B. japonicum* USDA 110 fueron obtenidas por Louch y col. (2001). Los análisis de espectroscopía y resonancia magnética nuclear, revelaron que esta fracción es una forma dimérica con unidades pentasacáridas repetidas.

4.2. Organización genética y función de genes implicados en la biosíntesis de EPSs.

Debido a que este aspecto ha sido estudiado en profundidad en *S. meliloti*, toda la información que se desarrolla a continuación está referida a este microorganismo.

El genoma de *S. meliloti* consiste en un cromosoma y dos megaplásmidos simbióticos (pSyma y pSymb). Los genes *exo* o *exs* que dirigen la síntesis del EPSI y los genes *exp* involucrados en la producción del EPSII se encuentran en el megaplásmido pSymb separados por aproximadamente 200 Kb. No obstante, se encontraron 5 loci involucrados en la biosíntesis del EPSI (*exoR*, *exoS*, *mucR*, *exoC* y *exoD*) que poseen ubicación cromosomal.

Mediante diversas metodologías moleculares tales como mutagénesis dirigida, secuenciación génica y análisis funcional de genes, se lograron identificar en *S. meliloti* numerosos loci involucrados en la biosíntesis de EPSs. Al menos 22 genes *exo* se encontrarían agrupados en una región de 25 Kb y codificarían proteínas requeridas en la síntesis de precursores y unidades repetidas, en la polimerización, en la exportación y en la degradación del EPSI (Tabla III-1).

La biosíntesis del EPSI requiere de nucleótidos de azúcares con dos grupos fosfatos (UDP-glucosa y UDP-galactosa) que representan los precursores activados y serían sintetizados por las proteínas ExoC, ExoB y ExoN (Buendía y col., 1991; Becker y col., 1993b; Glucksmann y col., 1993a). Como se indicó anteriormente, las vías biosintéticas de los polisacáridos de la superficie bacteriana se encuentran interconectadas. Así, la actividad enzimática de las proteínas ExoC y ExoN resulta esencial para la biosíntesis del EPSI, EPSII, LPS y glucanos cíclicos (1-2) (Uttaro y col., 1990) (figura III-4).

Tabla III-1. Propiedades de los genes *exo* y sus productos génicos, involucrados en la biosíntesis del EPS I en *S. meliloti* SU47.

<i>Proteína</i>	<i>Localización de la proteína</i>	<i>Función probable</i>	<i>Localización del gen</i>
ExoC	Citoplasma	Fosfoglucmutasa	CR
ExoB	Citoplasma	UDP-glucosa-4-epimerasa	MP2
ExoN	Citoplasma	UDP-glucosa pirofosforilasa	MP2
ExoY	Anclada a membrana	Galactosil transferasa	MP2
ExoA	Anclada a membrana	Glucosil transferasa	MP2
ExoL	Citoplasma	Glucosil transferasa	MP2
ExoM	Citoplasma	Glucosil transferasa	MP2
ExoO	Citoplasma	Glucosil transferasa	MP2
ExoU	Anclada a membrana	Glucosil transferasa	MP2
ExoW	Citoplasma	Glucosil transferasa	MP2
ExoZ	Integral de membrana	Acetil transferasa	MP2
ExoH	Integral de membrana	Succinil transferasa	MP2
ExoV	Citoplasma	Piruvil transferasa	MP2
ExoF	Periplasma o extracelular	Galactosil transferasa	MP2
ExoQ	Integral de membrana	Exportación y polimerización	MP2
ExoT	Integral de membrana	Exportación y polimerización	MP2
ExoP	Integral de membrana	Exportación y polimerización	MP2
ExsA	Integral de membrana	Exportación	MP2
ExoK	Periplasma o extracelular	Endo- -1,3-1,4-glicanasa	MP2
ExsH	Periplasma o extracelular	Endoglicanasa	MP2
ExoX	Anclada a membrana	Regulador negativo	MP2
ExoI	Periplasma o extracelular	Desconocida	MP2
ExsB	Citoplasma	Regulador negativo	MP2
ExoR	Citoplasma	Regulador negativo	CR
ExoS	Anclada a membrana	Regulador negativo	CR
MucR	Citoplasma	Regulador positivo	CR
ExoD	Citoplasma	Desconocida	CR

Abreviaturas: (CR) Cromosoma; (MP2) Megaplásmido 2 (o pSymb).

Dada la compleja estructura de los exopolisacáridos, es de esperar que su biosíntesis involucre varios pasos secuenciales. Las enzimas ExoY y ExoF son responsables de la transferencia inicial del residuo galactosil al lípido aceptor (undecaprenol), mientras que la adición de los siguientes azúcares es catalizada por las enzimas ExoA, ExoL, ExoM, ExoO, ExoU y ExoW. Aún no se ha identificado el gen que codifica para la glicosiltransferasa responsable de la adición del azúcar terminal de la subunidad repetida. La incorporación de grupos acéticos y succínicos a la molécula de succinoglicano es realizada por las proteínas de membrana ExoZ (Reuber y col., 1993a) y ExoH (Leigh y col., 1987), respectivamente (figura III-4). Se ha demostrado que la adición de sustituyentes pirúvicos (catalizada por ExoV) resulta esencial tanto para una

eficiente polimerización como para la exportación del succinoglicano, ya que dicho polímero no es secretado al medio extracelular en mutantes *exoV* (Reuber y col., 1993b).

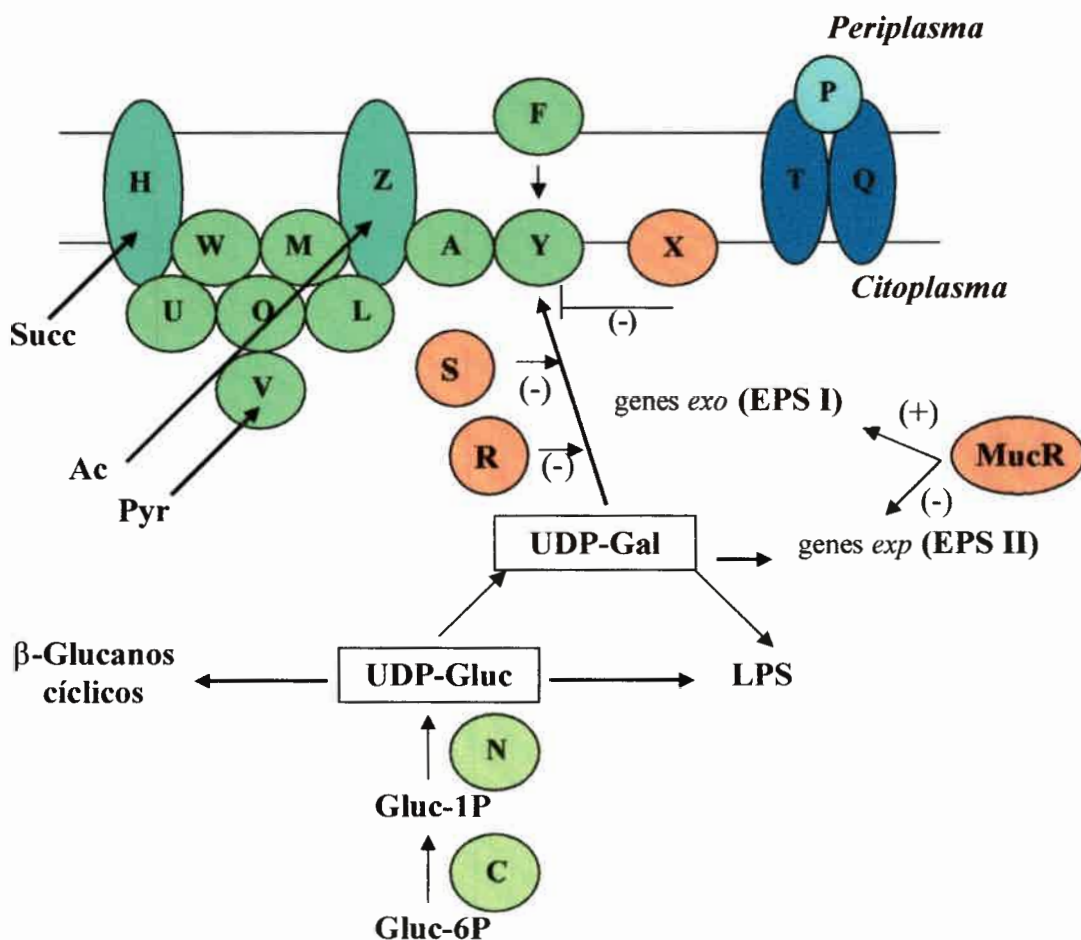


Figura III-4: Modelo sugerido de la posible localización de proteínas Exo que participan en la síntesis, polimerización, exportación y regulación del EPSI de *S. meliloti*. Abreviaturas: Gluc, glucosa; Gal, galactosa; UDP, uridina difosfato; P, fosfato; Succ, ácido succínico; Ac, ácido acético; Pyr, ácido pirúvico; (+) regulación positiva; (-) regulación negativa.

Las proteínas ExoP, ExoQ y ExoT desempeñan un rol específico en las etapas finales de la biosíntesis del succinoglicano. Mediante la electroporación de mutantes *exo*⁻ de *S. meliloti* con nucleótidos de azúcares marcados radiactivamente, Gonzáles y col. (1998) obtuvieron evidencias de que la síntesis de oligosacáridos de alto y bajo peso molecular se realiza por mecanismos diferentes. La síntesis de las subunidades de alto PM del succinoglicano requiere de las proteínas ExoP/ExoQ mientras que la síntesis

de las fracciones de bajo PM (dímeros y trímeros) requiere de las proteínas ExoP/ExoT.

Además de las proteínas mencionadas, otras enzimas con actividad glucanasa (ExoK y ExsH), capaces de depolimerizar las cadenas nacientes de EPSs, regularían el tamaño específico de las moléculas oligosacáridas en función de las diferentes condiciones ambientales presentes durante todo el proceso de nodulación (Glucksmann y col., 1993b).

Mientras que las funciones de los genes *exo* que dirigen la síntesis del EPSI han sido intensamente estudiadas, poco se sabe acerca de la función de los productos génicos involucrados en la biosíntesis del EPSII. A diferencia del conjunto de genes *exo*, éstos consisten en una región génica de 32 Kb cuyos genes agrupados se conocen con el nombre de genes *exp* (Mendrygal y col, 2000).

El análisis de homología de secuencias de aminoácidos de los productos de genes *exp* con proteínas de función conocidas permitió proponer posibles funciones de 17 proteínas Exp (Becker y Pühler, 1998) (Tabla III-2).

Tabla III-2. Función y localización de las proteínas Exp en *S. meliloti* SU47.

<i>Proteína</i>	<i>Localización</i>	<i>Función probable</i>
ExpG	Citoplasma	Regulador transcripcional
ExpA7	Citoplasma	Glucosa-1-fosfato-timidiltransferasa
ExpA8	Citoplasma	dTDP-4-dehidroramnosa 3,5 epimerasa
ExpA9	Citoplasma	dTDP-glucosa 4,6 epimerasa
ExpA10	Citoplasma	dTDP-4-dehidroramnosa reductasa
ExpA2	Citoplasma	Glicosil transferasa
ExpE2	Citoplasma	Glicosil transferasa
ExpA3	Citoplasma	Glicosil transferasa
ExpC	Anclada a membrana	Glicosil transferasa
ExpE4	Citoplasma	Glicosil transferasa
ExpE7	Citoplasma	Glicosil transferasa
ExpD1	Integral de membrana	Proteína ABC transportadora del complejo de proteínas de exportación.
ExpD2	Membrana citoplasmática y membrana externa	Proteína MFP del complejo de proteínas de exportación.
ExpE1	Membrana externa o extracelular	Proteína de unión a Ca ⁺⁺
ExpE3	Citoplasma	Metiltransferasa
ORF23	Periplasma	Proteína de unión periplásmica
ExpA1	Citoplasma	Desconocida
ExpA4	Citoplasma	Desconocida
ExpA5	Citoplasma	Desconocida
ExpA6	Periplasma	Desconocida
ExpE5	Anclada a membrana	Desconocida
ExpE6	Integral de membrana	Desconocida
ExpE8	Citoplasma	Desconocida
ExpG	Citoplasma	Regulador transcripcional

4.3. Mecanismos de regulación de la biosíntesis de EPSs.

En *S. meliloti*, la síntesis de EPSs es regulada mediante complejos mecanismos. Los genes *mucR* (Keller y col., 1995) y *expR* (Glazebrook y Walker, 1989) regulan la expresión de los genes de la biosíntesis del EPSI (*exo*) y EPSII (*exp*), respectivamente. La regulación negativa de la transcripción de otros genes *exo* estaría bajo el control del gen *exoR* (Reed y col., 1991). Mutaciones en este gen o en el regulador negativo *exoS* resultan en un incremento de la producción del EPS I (fenotipo mucoide) y en defectos en la nodulación de plantas de alfalfa. El control postranscripcional de la producción del succinoglicano es realizado por el gen *exoX* (Ozga y col., 1994). Por otra parte, el gen *syrM* desempeña una función importante en la determinación del contenido y proporción de las fracciones HMW y LMW (Dusha y col., 1999).

4.4. Rol en la simbiosis.

Su localización en la superficie de la membrana externa los hace particularmente indicados para actuar en la protección celular contra factores ambientales y en la adherencia a distintas superficies. Además, dada su diversidad estructural, podrían actuar como moléculas importantes en la comunicación célula-célula (Becker y Pühler, 1998).

Es conocido que los EPSs rizobianos juegan un papel importante en la invasión y formación de nódulos en las leguminosas. Durante varios años se postuló que dichos polisacáridos serían esenciales sólo para la invasión y formación de nódulos en leguminosas que forman nódulos indeterminados. En este sentido, plantas huéspedes de *Medicago sp.*, *Trifolium sp.*, *Vicia sp.*, *Leucaena sp.*, desarrollaron nódulos vacíos como consecuencia de la formación de hilos de infección abortados cuando fueron inoculadas con mutantes *exo⁻* de *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* o bv. *viciae* y *Rhizobium sp.* NGR234, respectivamente (Finan y col., 1985, Leigh y col., 1985, Leigh y col., 1988; Djodveric y col., 1987; Skorupska y col., 1995, Parveen y col., 1997, Rolfe y col., 1996). Sin embargo, estudios realizados por otros autores demostraron que las asociaciones con leguminosas que forman

nódulos determinados también se ven afectadas cuando son inoculadas con rizobios deficientes en la producción de EPSs (Kim y col., 1989; Leigh y Coplin, 1992). Kosch y col. (1994) demostraron que la mutante EPS⁻ *B. japonicum* Δ P22 presentó severos defectos en el proceso de nodulación cuando se la inoculó a diferentes plantas huésped que forman nódulos determinados (*Glycine max*, *Macroptilium atropurpureum*, *Vigna radiata*). Posteriormente, Eggleston y col. (1996) observaron una marcada disminución en el número de nódulos y clorosis en las hojas de plantas de soja (*G. max*) inoculadas con mutantes EPS⁻ de *B. japonicum*, indicando una notable deficiencia de nitrógeno.

Se ha informado que el tamaño molecular de estos polisacáridos influye notablemente sobre la actividad simbiótica. La invasión en alfalfa (*M. sativa*) por mutantes *exo*⁻ de *S. meliloti* pudo ser restaurada mediante la adición exógena del EPS I obtenido de la cepa silvestre de *S. meliloti* (Battisti y col., 1992). No obstante, dicha reversión del fenotipo se observó cuando se agregaron pequeñas cantidades de la forma trimérica de la fracción HMW indicando que la misma sería la especie simbióticamente activa, responsable de promover la invasión en el nódulo (Urzainiqui y col., 1992; Wang y col., 1999). Por otra parte, la adición de polímeros de bajo PM que consisten en 15 a 20 unidades disacáridas repetidas del galactoglucano permite que mutantes de *S. meliloti* deficientes en la producción del EPS I o del EPS II formen nódulos funcionales en estas plantas (Leigh y Lee, 1988; Battisti y col., 1992, Gonzáles y col., 1996).

Debido a que los rizobios establecen un contacto muy estrecho con sus plantas huéspedes, comportándose como parásitos en los primeras etapas de la simbiosis, es de esperar que las plantas desencadenen diversas respuestas de defensa para impedir la infección de sus tejidos. Evidencias recientes demuestran que los EPSs rizobianos permiten a los rizobios evadir las moléculas de defensa de las plantas (Rolfe y col. 1996; Fraysse y col., 2003; Mazur y col., 2003). Utilizando mutantes *exoB*⁻ de *B. japonicum* (que producen EPSs modificados, sin moléculas de galactosa, pero conservan los LPSs), Parniske y col. (1994) observaron una acumulación de fitoalexinas en las

etapas tempranas de la interacción con *Glycine max*. Estos compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular son normalmente inducidos en presencia de microorganismos patógenos como *Phytophthora megasperme*. Salzwedel y Dazzo (1993) postularon que cuando los rizobios son atrapados en los pelos radicales curvados, los EPSs podrían suprimir la actividad peroxidasa de la planta, ayudando a las bacterias a evadir este mecanismo de defensa y desarrollar hilos de infección persistentes. Resultados interesantes fueron informados por Mazur y col. (2002) y Wielbo y col. (2004) utilizando mutantes derivadas *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1, que producen cantidades reducidas de EPSs. Particularmente, la mutante RtP20 que mostraba una disminución del 43% en el contenido de EPSs, desarrolló dos tipos de nódulos en plantas de trébol (*T. pratense* cv Ulka). Un alto número de ellos mostró inicialmente una morfología similar a los nódulos desarrollados en plantas inoculadas con la cepa parental. Cuando estos nódulos maduraron se observaron zonas no infectadas y acumulación de gránulos de almidón, aunque no se detectaron moléculas de defensa de las plantas en los mismos. El otro tipo de nódulos fue más pequeño y redondo, los rizobios ocuparon sólo un limitado número de células y se observó la acumulación de compuestos fenólicos en las paredes celulares vegetales. Estos resultados demuestran que la cantidad de EPSs producida por estas bacterias afectaría la colonización de los nódulos y desencadenaría diferentes respuestas de defensa en las plantas.

En conjunto, estos antecedentes ofrecen distintas interpretaciones no excluyentes acerca del posible rol simbiótico de los EPSs:

- 1- La dependencia de EPSs rizobianos para las simbiosis efectivas en leguminosas que forman nódulos indeterminados podría atribuirse a factores vinculados con la formación de este tipo de nódulos. Se ha informado que los hilos de infección que se desarrollan en plantas que forman nódulos indeterminados poseen un diámetro mayor que los que conducen bacterias hacia el interior de los nódulos determinados. Si los EPSs son componentes de la matriz extracelular contenida en los hilos de infección, luego su secreción sería más crítica para el proceso de formación de los nódulos indeterminados (Stacey y col., 1991). Además, se debe tener en cuenta que en este tipo de

nódulos las bacterias invaden las células corticales por medio de la penetración continua de los hilos de infección, mientras que en los del tipo determinado las bacterias se distribuyen por división de células previamente infectadas (Leigh y Coplin, 1992).

2- La complementación del fenotipo simbiótico en mutantes *exo⁻* de *S. meliloti* luego de la adición de pequeñas concentraciones de las formas activas del EPS I o del EPS II, sugiere que los EPSs actuarían como moléculas señal más que como componentes estructurales de la matriz de los hilos de infección.

3- La presencia de hilos de infección abortados conteniendo en su interior abundantes cantidades de mutantes *EPS⁻* sugiere incoordinación entre el crecimiento bacteriano y el de los hilos de infección. Probablemente, los EPSs estén involucrados en una adecuada organización del citoesqueleto del pelo radical de manera tal que el crecimiento de los hilos de infección sea rápido y altamente polarizado (Pellock y col., 2000). Coincidentemente, van Workum y col. (1998) sugieren que en *R. leguminosarum* bv. *viciae* los EPSs actuarían como señales que aceleran tanto el curvado de los pelos como el desarrollo de los hilos de infección, de manera tal que la penetración rizobiana preceda a las respuestas de defensa desencadenadas por la planta huésped ante la invasión de los rizobios. Sin embargo, no se ha estudiado aún el mecanismo molecular por el cual ello ocurre.

4- La ausencia de hilos de infección persistentes en plantas de *Vicia sativa* inoculadas con mutantes *EPS⁻* de *R. leguminosarum*, estaría asociada a una aglutinación bacteriana mediada por fibrillas de celulosa. Estas fibrillas se expresan en la superficie celular bacteriana, inducidas por compuestos derivados de las plantas (Ausmees y col., 1999). Probablemente, las fibrillas de celulosa bloquean la colonización de los hilos de infección por mutantes *EPS⁻* debido a una floculación persistente de las bacterias que quedan atrapadas en los pelos radicales curvados impidiendo de este modo su ingreso a los hilos de infección (Laus y col., 2005). El agregado bacteriano dentro de los hilos de infección también ha sido observado en raíces de alfalfa infectadas por bacterias *EPS⁻* de *S. meliloti* (Cheng y Walter., 1998; Pellock y col., 2000).

5- La observación de diferentes síntomas de defensa en los tejidos de las plantas infectadas por mutantes EPS⁻ (síntesis de fitoalexinas, formación de papilas con deposición de callosa, producción masiva de O₂⁻ y H₂O₂, entre otros) destaca el rol activo de estos polisacáridos como moduladores de las respuestas de defensa de las plantas (Lodeiro y col., 2004; Gage y col., 2004) .

OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO.

Si bien se ha estudiado intensamente el rol de los EPSs y de los glucanos cíclicos en la asociación simbiótica con leguminosas que son infectadas mediante hilos de infección (tanto las que conducen a la formación de nódulos determinados como indeterminados), no se dispone actualmente de información acerca de su rol en la interacción con leguminosas que como maní, son infectadas por el mecanismo de "crack entry".

Objetivo General.

- *Contribuir al conocimiento del rol que cumplen los polisacáridos de superficie rizobiana en el mecanismo de infección por "crack entry" que ocurre en maní.*

Objetivos Específicos.

- *Obtener mutantes no productoras de EPS y/o β -glucanos cíclicos a partir de microsimbiontes nativos nodulantes de maní.*
- *Determinar si dichos polisacáridos participan en la interacción maní-rizobio.*

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Microorganismos y Plásmidos.

	Bacterias	Características	Referencias
Cepas de <i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294, <i>thi pro hsdR- recA</i> RP4 integrado en el cromosoma, 2 Tc::Mu - Km :: Tn7	Simon y col., (1983)
	<i>E. coli</i> CC118	<i>araD139 Δ(ara, leu) 7697 ΔlacX74 phoAΔ20 galE galK thi rpsE ppoB argEΔam recA1</i>	Manoil y col., (1985)
	<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA1, ΔlacU169, Φ80dlacZM15</i> para clonado de plásmidos y cósmidos, cepa supresora deficiente en recombinación.	Hanahan y col., (1983)
	<i>E. coli</i> JM109	cepa deficiente en recombinación portadora del vector de clonado pBluescript SK	Sambrook y col., (1989)
Cepas rizobianas	<i>S. meliloti</i> 102F34nal	Cepa de referencia	Ditta y col., (1980)
	TY7	Mutante transposicional no productora de β-glucanos cíclicos (<i>ndvB::Tn5</i>), derivada de <i>S. meliloti</i> 102F34nal	Ielpi y col., (1990)
	NET30 (*)	Aislamiento nativo de la localidad de Etruria (Cba). Nodulante de maní	Taurian y col., (2002; 2005)
	NCHA22 (*)	Aislamiento nativo de la localidad de Charras (Cba). Nodulante de maní	Taurian y col., (2002; 2005)
	M1024	Mutante alterada en la producción de EPS, portadora del mTn5SS <i>celB</i> 31 (derivada de NET30)	Este trabajo
Plásmidos	pJQ501	pACYC184-mob Tc ^R Cm ^R Gm ^R utilizado para mutagénesis dirigida con un fragmento interno <i>EcoR</i> 1 de 432 pb del gen <i>ndvA</i> de <i>B. japonicum</i> 110 <i>spc4</i> .	Quandt y col., (1991)
	pAS131	plásmido utilizado para mutagénesis transposicional con mTn5 <i>celB</i> , mTn5SS <i>celB</i> 31 en pUT/mini Tn5, Sp ^R -Sm ^R (figura 1)	Sessitsch y col., (1996)
	pBluescript SK	Ap ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>f1</i> (+) <i>ori</i> , pUC <i>ori</i> , alto número de copias, derivado de M13, vector de clonado y secuenciamiento	Storz y col., (2000)
	pUC19	2.7 Kb; Ap ^R , ColE1 <i>ori</i>	Yannisch-Perron y col., (1985)
	pCR®2.1-TOPO	Vector de clonado, Km ^R , Ap ^R , <i>lacZ</i>	Invitrogen, Inc.

(*) En el anexo se adjunta información acerca de las características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos.

2. Métodos de conservación de cepas bacterianas.

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelación rápida de cultivos en fase logarítmica tardía suplementados con glicerol estéril en una concentración final del 20% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80°C .

3. Medios de Cultivo

Medio TY (Beringer, 1974)
1989)

CaCl ₂ 2H ₂ O	0.5 o 0.9 g
Triptona	5 g
Extracto de Levadura	3 g
H ₂ O csp	1000 ml
Agar-Agar	15 g

PH: 6.8 – 7.0

Medio YEMA (Vincent, 1970)

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de Levadura	1 g

Medio LB (Sambrook y col,
1989)

NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	3 g
H ₂ O csp	1000 ml
Agar-Agar	15 g

pH: 6.8 – 7.0

Manitol	10 g
Agar-Agar	15 g
H ₂ O csp	1000 ml
pH: 6.8 – 7.0	

Se suplementó con 10 ml de Rojo Congo diluido 1/400 (P/V) en agua destilada.

Medio MM (Robertsen y col., 1981)

K ₂ HPO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15 g
CaCl ₂	0.05 g
FeCl ₃	0.06 g
NaCl	0.05 g
Glutamato sódico	1.1 g
Manitol	10 g
Biotina	0.0002 g
Pantotenato	
Cálcico	0.0001 g
H ₂ O csp	1000 ml
Agar-Agar	15 g
pH: 6.8 – 7.0	

Medio MM1 (Peoples y col., 1989)

MgSO ₄	0.39 g
K ₂ SO ₄	0.45 g
PO ₄ H ₃ 1.1M	12 ml
FeSO ₄ 7H ₂ O	15 g

Microelementos	24	ml
H ₂ O csp	1000	ml
Agar-Agar	15	g
Microelemetos: CuSO ₄ 20 mg l ⁻¹ , ZnSO ₄ 6H ₂ O 100 mg l ⁻¹ , MnSO ₄ 4H ₂ O 100 mg l ⁻¹ , CaCl ₂ 2H ₂ O 2.6 mg l ⁻¹ .		

El pH se ajustó a 6.8 con NaOH y se esterilizó por autoclavado. Se adicionó CINH₄ a una concentración final de 0.1% como fuente de nitrógeno y Fructosa a una concentración final de 1% P/V, como fuente de carbono.

Medio Harada (Amemura y col., 1974)

(NH ₄)HPO ₄	1.5	g
KH ₂ PO ₄	1	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	g
NaCl	0.01	g
MnCl ₂ 7H ₂ O	0.01	g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.01	g
Glucosa	1	g
H ₂ O csp	1000	ml
Agar-Agar	15	g

pH: 7.0 – 7.2

Medio GYT (Tung y Chow, 1995)

Extracto de		
Levadura	1.25	g
Triptona	1.25	g
Glicerol	10%	v/v
H ₂ O csp	1000	ml

4. Antibióticos.

Los antibióticos requeridos fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas 1000 veces respecto de la concentración final de los mismos en el medio de cultivo. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.2 μm de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron las siguientes: Kanamicina (Km): 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Ampicilina (Ap): 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Spectinomycin (Sp): 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Streptomycin (Sm): 200-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$

5. Obtención de mutantes deficientes en la producción de EPSs a partir de aislamientos nativos nodulantes de maní.

Se realizó una mutagénesis al azar del aislamiento nativo NET30 por conjugación biparental con la cepa donadora *E. coli* S17-1, portadora del plásmido pAS131 (mTn5SSce/B31), según la metodología descrita por Simon y col. (1983). El transposón mTn5SSce/B31 posee la característica de que la transposasa se encuentra en posición *trans*, lo que asegura que su inserción en el genoma bacteriano es estable, minimizando posibles eventos de reinsertión (de Lorenzo y col., 1990). Además, la expresión del gen *ce/B* está bajo el control del promotor del gen *nifH* (Sessitsch y col., 1996).

La selección de los transconjugantes se realizó en placas de medio mínimo MM suplementado con Sp (80 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y se purificaron por repetidos pasajes en placas de MM suplementadas con dicho antibiótico.

Los exoconjugantes que presentaron el fenotipo de interés fueron luego analizados para seleccionar mutantes deficientes en la producción de EPSs.

5.1. Identificación de mutantes deficientes en la producción de EPSs.

Técnica de Sudan Black B.

Los medios MM1 y Harada se utilizaron para identificar mutantes deficientes en la producción de EPS I y/o EPS II, respectivamente.

Las colonias transconjugantes se repicaron en placas conteniendo los medios suplementadas con Sp ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$) las que fueron incubadas en estufa a 28°C durante 24 hs. Se adicionaron 8 ml de una solución de Sudan Black (0.02% en etanol 95%) a cada placa y se dejó en reposo durante 10 min. El colorante fue eliminado y las placas fueron posteriormente decoloradas con 10 ml de etanol. Las colonias de bacterias afectadas en la producción de EPSs se identificaron por su incapacidad de retener el colorante (Liu y col., 1998). Este método permite detectar mutantes deficientes tanto en la producción cuantitativa como cualitativa de succinoglucano (EPS I) y/o de galactoglucano (EPS II). De este modo se seleccionó una posible mutante que se denominó M1024.

6. Obtención de mutantes deficientes en la producción de glucanos cíclicos β (1-2) a partir de aislamientos nativos nodulantes de maní.

6.1. Mutagénesis al azar.

Se realizó una mutagénesis al azar del aislamiento nativo NET30 por conjugación biparental con la cepa donadora *E. coli* CC118 λ pir (mTn5phoA). Para ello se mezclaron 770 μl de la cepa dadora (DO_{620} : 0.6) y 770 μl de la receptora (DO_{620} : 0.8-0.9). La suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. El pellet se resuspendió en 50 μl de TY y se sembró en placas conteniendo el mismo medio las que fueron incubadas a 28°C durante toda la noche. El crecimiento bacteriano se resuspendió en 1 ml de medio YEM y alícuotas de 100

μl fueron plaqueadas en medio mínimo MM con BCIP ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$) y Km ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$). Los transconjugantes se purificaron por pasajes sucesivos en placas de medio MM suplementadas con Km.

5.3.2. Mutagénesis Dirigida.

a) Estrategia I:

Se realizó una mutagénesis dirigida del aislamiento nativo NET30 por conjugación biparental con la cepa donadora *E. coli* S17-1 portadora del plásmido pJQ501 con un fragmento *EcoR*I de 432 pb correspondiente al gen *ndvA* de *B. japonicum* 110 spc4.

Para ello se mezclaron 200 μl de un cultivo de la cepa dadora (DO_{620} : 0.6) con 1000 μl de un cultivo de la receptora (DO_{620} : 0.8-0.9). La suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. El pellet se resuspendió en 50 μl de TY y se sembró en una placa conteniendo el mismo medio la que fue incubada a 28°C durante toda la noche. El crecimiento bacteriano se resuspendió en 1 ml de medio rico y alícuotas de 100 μl fueron plaqueadas en medio mínimo MM con los antibióticos Tetraciclina (Tc) y Gentamicina (Gm). Los transconjugantes se purificaron por pasajes sucesivos en placas de medio mínimo MM suplementadas con los antibióticos correspondientes.

b) Estrategia II:

Debido a que no se conoce la secuencia de genes vinculados con la síntesis de β -glucanos en microsimbiontes de maní, se realizó un alineamiento de los genes *ndvA* de *A. tumefaciens*, *M. loti* y *S. meliloti* con el objetivo de obtener la secuencia consenso correspondiente. Los cebadores G1 (5'GCGGGTTTCGGCGTCTT 3') y G2 ('CATCCTGGAACACCG TGGCCG3') fueron sintetizados por FAGOS (Bs. As) y obtenidos en forma liofilizada. Para su utilización, fueron resuspendidos en un volumen adecuado de agua deionizada

tridestilada estéril. Estos cebadores permiten la amplificación de un producto de 1,06 Kb. El volumen de la reacción de amplificación fue de 20 μl y contenía 4 μl de ADN molde ($5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$), 0.2 μl de Taq polimerasa, 0.2 μM de desoxinucleótidos y 10 μM de cada cebador. Como control negativo se utilizó agua deionizada estéril.

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo mediante el siguiente ciclo:

95°C	1 min	}	x 33
94°C	1 min		
58°C	1 min		
72°C	2 min		
72°C	10 min		

Extracción de los fragmentos de ADN del gel de agarosa.

Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa utilizando como patrón de peso molecular el ADN del fago λ digerido por restricción enzimática *EcoRI/HindIII* (Promega). Una vez localizado, el fragmento de interés (aproximadamente 1100 pb) se extrajo utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Ligación.

Se realizó una ligación del fragmento de 1100 pb amplificado por PCR con el vector de clonado pCR[®]2.1-TOPO, según las especificaciones del fabricante (INVITROGEN).

El volumen de reacción fue de 6 μl y contenía:

Producto de PCR	4 μl
Sol. Salina	1 μl
Vector pTOPO	1 μl

Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli*.

Las células electrocompetentes se prepararon según Tung y Chow (1995). Brevemente, se inocularon 100 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo denso de *E. coli*. El cultivo se incubó a 37°C en baño termostatzado con agitación (150 rpm) hasta que alcanzó una $DO_{600} \approx 0.6$ y luego se centrifugó a 4°C durante 7 min a 8000 rpm. Posteriormente se realizaron dos lavados con glicerol 10% y finalmente las células se resuspendieron en medio GYT y se mantuvieron a -80°C.

Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* S17-1.

La transformación por electroporación se realizó en cubetas de 0.2 ml utilizando un equipo Gene Pulser (BioRad). Se adicionaron 2 μ l de la mezcla de ligación a 50 μ l de células competentes de *E. coli* S17-1 y se siguió la metodología descrita por INVITROGEN, Inc. Las células se cultivaron en medio LB durante 1 h en baño termostatzado a 37°C con agitación (150 rpm) y se sembraron en placas de LB suplementadas con Ap (50 μ g ml⁻¹) y X-Gal (40 μ g ml⁻¹). Las placas se incubaron a 37°C en estufa hasta la aparición de colonias.

Secuenciación del fragmento amplificado por PCR.

Se realizó una extracción plasmídica a partir de las colonias transformantes que crecieron en el medio selectivo apropiado. La presencia del gen *ndvA* clonado fue confirmado por digestión del plásmido extraído con la enzima *EcoRI* así como por PCR utilizando los cebadores G1 y G2. La muestra plasmídica extraída fue enviada a MacroGen Inc. Laboratories (Corea) para su secuenciación utilizando los cebadores universales M13F y M13R.

c) Estrategia III:

Diseño de cebadores.

Se utilizó el software Vector NTI Suite para el diseño de oligonucleótidos a partir de la secuencia del gen *ndvB* de *S. meliloti* disponible en el banco de datos. Estos cebadores permiten la amplificación de un producto de 1.74 Kb que tiene un único sitio de corte para la enzima *HindIII* lo cual posibilita la inserción de un cassette de *Sp* para interrumpir el producto amplificado. Esta construcción será utilizada posteriormente para eventos de mutagénesis dirigida.

Los cebadores fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Inc) (Coralville, U.S.) y obtenidos en forma liofilizada. Para su utilización, fueron resuspendidos en un volumen adecuado de agua deionizada tridestilada estéril.

Amplificación mediante PCR del gen *ndvB* de los aislamientos nativos nodulantes de maní.

Para amplificar un fragmento interno del gen *ndvB* de los aislamientos nativos NET30 y NCHA22 se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

SMs: 5'AGGACACAGGAGGTCGTGAC 3'

SMas: 5' TCCTTGAGCACCAGCAGAC 3'

El volumen de reacción fue de 50 μ l y contenía 1 μ l de ADN molde (34 ng μ l⁻¹), 0.5 μ l de Taq polimerasa, 0.2 μ M desoxinucleótidos, 10 μ M de cada cebador y 1.5 mM de MgCl₂. Además se ensayó la amplificación por PCR en condiciones de alta concentración de MgCl₂ (6 mM). Como control positivo se utilizó ADN genómico de *S. meliloti* 102F34nal y como control negativo H₂O deionizada estéril.

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo mediante el siguiente ciclo de reacciones:

94°C	5 min	} x 35
94°C	1 min	
58.7°C	1 min 30 seg	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron separados en alícuotas de 20 μ l, mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.2% conteniendo TBE 0.5X y Bromuro de Etidio, y visualizados en transiluminador de luz UV. Luego de su purificación fueron secuenciados en la Fundación Instituto Leloir Buenos Aires.

Otra metodología utilizada con el fin de obtener mutantes deficientes en la producción de β -glucanos cíclicos a partir de microsimbiontes de maní consistió en obtener un fragmento *EcoRI* de la mutante transposicional *ndvB*⁻ de *S. meliloti* TY7 para su posterior inserción en el genoma de NET30 mediante doble recombinación homóloga. Para ello se digirió con la enzima *EcoRI*, 1300 ng de ADN genómico de la mutante *S. meliloti* TY7 (Ielpi y col., 1990). Dicha enzima se seleccionó porque no posee sitios de corte sobre el transposón.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

ADN	5 μ l
Buffer D	2 μ l
H ₂ O	10 μ l
BSA	2 μ l
Enzima	1 μ l

La mezcla de digestión fue incubada durante toda la noche a 37°C. La enzima fue inactivada por calentamiento a 65°C durante 15 min.

Digestión del vector pUC19.

Aproximadamente 550 ng del vector pUC19 fueron digeridos con la enzima *EcoRI* en la siguiente mezcla de reacción:

pUC19	5 µl
Buffer D	2 µl
H ₂ O	10 µl
BSA	2 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl

La mezcla de digestión fue incubada durante toda la noche a 37°C. La enzima fue inactivada por calentamiento a 65°C durante 15 min.

Ligación.

Posteriormente se realizó una ligación del ADN genómico de *S. meliloti* TY7 con el vector pUC19, ambos digeridos con la enzima *EcoRI*.

El volumen de reacción fue de 25 µl y contenía:

ADN/ <i>EcoRI</i>	15 µl
pUC19/ <i>EcoRI</i>	5 µl
Buffer Ligasa	2.5 µl
Enzima	2 µl
H ₂ O	25 µl

La mezcla de ligación fue incubada durante toda la noche a 16°C.

Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α .

La transformación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección selección 5.3.2. (b) de Materiales y Métodos (Capítulo III). La selección de los clones transformantes se realizó en placas de LB conteniendo los antibióticos Km y Ap.

Secuenciación del fragmento clonado en el vector pUC19.

Se realizó una extracción plasmídica a partir de las colonias transformantes crecidas en el medio selectivo apropiado. La muestra plasmídica extraída fue enviada a Macrogen Inc. Laboratories (Corea) para su secuenciación.

6.3. Análisis informático de las secuencias.

Las secuencias de referencia utilizadas fueron obtenidas de la base de datos Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>). El análisis de secuencias de nucleótidos se realizó utilizando el programa BLAST de acceso libre en el sitio informático <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> perteneciente a la NCBI (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine)

7. Caracterización fenotípica de la mutante alterada en la producción de exopolisacáridos.

7.1. Crecimiento de la mutante en distintas fuentes de carbono.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de la mutante se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo MM, utilizando como fuente de carbono los azúcares Manitol (10 g l⁻¹) o Galactosa (10 g l⁻¹). Para ello, las bacterias se cultivaron en medio mínimo MM a 28°C hasta fase exponencial tardía. A partir de

estos cultivos se tomaron alícuotas que fueron diluídas en 20 ml de medio fresco hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.05 unidades. Los cultivos se mantuvieron a 28°C con agitación (180 rpm) y se midió la absorbancia (A_{600}) a distintos tiempos en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 2.

7.2. Determinación del contenido de EPSs.

Cultivos bacterianos obtenidos en 20 ml de los medios MM1 (Fructosa 1 g l⁻¹), Harada (Glucosa 2.5 g l⁻¹) o YEM (Manitol 10 g l⁻¹) se centrifugaron 10 min a 8.000 rpm. Al sobrenadante se le adicionó etanol 95% frío en una proporción 1:3 (v/v) y se dejó toda la noche a -20°C. Luego de centrifugar a 8.000 rpm durante 25 min, el pellet se secó a 37°C y se pesó. Los EPSs obtenidos se resuspendieron en PBS en una relación 20 mg: 1 ml, y se dializaron contra agua corriente durante 24 h (Skorupska y col., 1985). La determinación cuantitativa de hexosas se realizó por el método de antrona (Dische y col., 1962) y se siguió el método de Bradford (1976) para la determinación de proteínas a partir del pellet celular. Los resultados se expresaron como mg hexosas/mg proteínas.

7.3. Análisis de la composición monosacárida de los EPSs por GLC.

Para determinar la composición de azúcares de los EPSs por cromatografía gaseosa, 5 mg de los polisacáridos se hidrolizaron durante 3 h a 100°C con 2N HCl. El análisis de las muestras por GLC fue realizado en el Dpto. Química Biológica de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA). Las muestras se redujeron con NaBH₄, se acetilaron y los acetatos de alditoles se extrajeron y se analizaron por GLC en una columna capilar SP2340 de 30 metros y 0.25 mm de diámetro interno. El programa de temperatura empleado se inició con 220°C aumentando 1°C min⁻¹ hasta alcanzar los 230°C. Los picos se identificaron por

comparación de los tiempos de retención con los testigos. Los resultados se expresan como porcentaje relativo (%) de tres determinaciones.

7.4. Determinación cualitativa de polisacáridos de superficie.

7.4.1. β - glucanos cíclicos.

Se realizó la extracción de β -glucanos cíclicos siguiendo la metodología descrita por Breedveld y col. (1995). Para ello, 5 ml de cultivos bacterianos (DO_{620} : 1) en medio YEM se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min. Los pellets se lavaron con agua y posteriormente se trataron con 200 μ l de etanol 75% (v/v) a 70°C durante 30 min. Luego de centrifugar a 700 rpm durante 20 min, el sobrenadante alcohólico se concentró bajo vacío. El residuo se disolvió en 20 μ l de agua y se utilizaron alícuotas de 5 μ l y 10 μ l para su separación por cromatografía en capa delgada (TLC) de sílica gel G60 (Sigma) utilizando como solvente de corrida etanol:butanol:agua (5:5:4). Las placas fueron reveladas con una solución de H_2SO_4 al 5% en metanol y calentadas por 10 min a 120°C.

7.4.2. Lipopolisacáridos (LPSs).

Se realizó una extracción rápida de los LPSs y posterior separación en geles de poliacrilamida al 20% (SDS-PAGE) siguiendo la metodología descrita por Laemli, (1970). Los geles se visualizaron mediante tinción con plata (Tsai y Frash, 1982).

8. Caracterización genotípica de la mutante alterada en la producción de exopolisacáridos.

8.1. Rep-Fingerprint genómico de la cepa parental y la mutante M1024.

Se realizó REP-PCR fingerprint a partir de ADN genómico de la cepa mutante M1024 y salvaje NET30. Para la amplificación se emplearon los cebadores Rep-1 (5' IIIICGICGICATCIGGC 3') y Rep-2 (5' ICGICTTATCIGGCCTAC 3'). El volumen de reacción fue de 15 μ l y contenía 1 μ M de cada cebador, 0.2 μ M de deoxinucleótidos, 3.5 μ l de ADN molde (5 ng μ l⁻¹), 0.55 U de Taq polimerasa. Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo con el siguiente ciclo:

95°C	1 min	}	35 ciclos
94°C	1 min		
52°C	1 min		
65°C	8 min		
68°C	16 min		

Los productos de amplificación, en alícuotas de 5 μ l, fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.2% conteniendo TBE 0.5X y Bromuro de Etidio, y visualizados en transiluminador de luz UV.

8.2. Amplificación de secuencias de inserción IS50 mediante PCR.

La reacción de amplificación en cadena de la polimerasa se llevó a cabo empleando los cebadores específicos para las secuencias de inserción del Tn5 (IS50L e IS50R):

ISL: 5'-GCTCGATCTAGAACGTTTCATGATAACTTCTGC-3'

ISR: 5'-TCTGCGACTGGCTTTCTAC-3'

En todos los casos se utilizaron 5 μl de ADN molde (concentración 5 ng μl^{-1}). Como control negativo se utilizó ADN de la cepa silvestre y como control positivo, el vector pAS131.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

H ₂ O	6.75 μl
Buffer	2.5 μl
dNTPs	2.5 μl
primers IS50L	2.5 μl
primers IS50R	2.5 μl
MgCl ₂	3.0 μl
ADN molde	25 ng
Taq polimerasa	0.25 μl

Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo mediante el siguiente ciclo de reacciones:

92°C	2 min.	
94°C	15 seg.	} 35 ciclos
53°C	10 seg.	
72°C	30 seg.	
72°C	3 min.	

Los productos de amplificación, en alícuotas de 5 μl fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% conteniendo Bromuro de Etidio, y visualizados en transiluminador de luz UV.

8.3. Estudio de la región génica interrumpida por el mTn5SSce/B31 mediante Southern Blot.

8.3.1. Extracción de ADN genómico.

Se siguió la metodología descrita por Ausubel y col. (1990). Para ello, 20 ml de un cultivo de la mutante M1024 en medio YEM fue centrifugado durante 10 min a 10000 rpm. El pellet se resuspendió en 5,67 ml de buffer TE y se agregaron 300 μ l de SDS (10%) y 30 μ l de proteinasa K (20 mg ml⁻¹). Se incubó durante 1 h a 37°C para producir la lisis celular y se adicionó 1 ml de NaCl 5 M frío agitando suavemente durante unos segundos. Luego de adicionar 800 μ l de CTAB (10%) se incubó durante 10 min a 65°C y se agregó un volumen similar de la mezcla cloroformo/ alcohol isoamílico en una proporción 24:1 agitando cuidadosamente. Se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm, recuperando la fase superior. Se agregó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25:24:1. Se homogeneizó suavemente, se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm y se recuperó nuevamente la fase superior. El ADN fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol durante 30 min a -20°C y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. El pellet recuperado fue lavado dos veces con etanol frío al 70% centrifugando durante 5 min a 10000 rpm luego de cada lavado. Se dejó secar el precipitado a 37°C y se resuspendió en 30-50 μ l de agua bidestilada estéril.

El ADN obtenido se cuantificó por comparación visual de la intensidad de fluorescencia en gel de agarosa al 0,8%, conteniendo bromuro de etidio, con relación al marcador estándar de ADN Lambda/*Hind*III, de concentración conocida. Las muestras fueron conservadas a -20°C.

8.3.2. Digestión del ADN genómico.

Aproximadamente 1140 ng de ADN fueron digeridos con las enzima de restricción *Xho*I o *Stu*I en la siguiente mezcla de reacción:

ADN	5 μ l
Buffer D	2 μ l
H ₂ O	10 μ l
BSA	2 μ l
Enzima	1 μ l

La mezcla de digestión fue incubada durante toda la noche a 37°C. Las enzimas fue inactivada por calentamiento a 65°C durante 15 min.

8.3.3. Separación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa.

La separación de los fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH:8). El voltaje empleado osciló entre 50 y 80 v cm⁻¹ según fue requerido y se utilizó como solución de carga Blue/Orange loading dye (Promega) en una relación 5 μ l de ADN/ μ l de solución de carga.

Los geles se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

8.3.4. Obtención y marcado de la sonda.

El plásmido pAS131 conteniendo el mTn5SSce/B31 fue digerido con la enzima de restricción *NotI* para obtener como sonda el fragmento *PnifH-ce/B* (Sonda C*) de 2.8 Kb. Los fragmentos de ADN digeridos adecuadamente se separaron en gel de agarosa y una vez localizado el fragmento de interés, se extrajo mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Dicho fragmento se marcó con [α -³² P] dCTP (Prime-a-Gene^R Labeling System,

Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se purificó por filtración molecular utilizando la columna Sephadex G-50 (Sigma).

8.3.5. Transferencia de ADN a membranas de nitrocelulosa.

El gel de agarosa 0.8% se incubó en una solución de HCl 0.25 N durante 20 min. Luego se lavó con agua destilada durante 15 min y posteriormente se lo neutralizó durante 20 min con una solución de OHNa 0.4 M. Se colocó el gel entre papeles absorbentes y la membrana de Nylon cargada positivamente (Hybond-N⁺, Pharmacia) sobre un puente de papel por el que circula por capilaridad la solución de transferencia (OHNa 0.4 M). La transferencia se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente. La membrana se neutralizó con SSC 6X durante 5 – 10 min y se dejó secar a 80° C durante 30 min.

8.3.6. Hibridización de ADN (Southern Blot)

Se utilizaron condiciones que favorecieron la hibridación de la sonda con regiones de ADN que presentaran alta similitud de secuencia. Los filtros se prehibridaron durante 2h a 65° C con una solución compuesta por SSC 6X (solución 20X con NaCl 3M y citrato de sodio 0.3 M ajustada a pH 7 con ácido cítrico), 0.1% SDS, ADN desnaturalizado de esperma de salmón 0.1 mg ml⁻¹ y solución de Denhardt 2X. Luego de desnaturalizar la sonda, ésta se añadió a la solución de prehibridación a una concentración de 5 x 10⁵ dpm ml⁻¹ y se dejó hibridar a 65°C durante toda la noche. Posteriormente, los filtros se lavaron 3 veces durante 15 min a 42°C con una solución de SSC 0.1X y SDS 0.1%, renovando la solución luego de cada lavado. La membrana se expuso a una película de diagnóstico 3M en oscuridad y a -80°C, hasta su revelado.

9. Comportamiento simbiótico de la mutante alterada en la producción de exopolisacáridos.

9.1. Ensayos de nodulación.

9.1.1. Esterilización de semillas de maní.

Semillas de maní cultivar *Runner* variedad *Tegua* INTA limpias, sanas y de tamaño uniforme, fueron esterilizadas superficialmente con etanol 95% durante 30 seg y luego sumergidas 15 min en H₂O₂ 15%. Finalmente se realizaron 5 – 6 lavados con H₂O destilada estéril (Somasegaran y Hoben, 1985) y se pregerminaron en oscuridad a 30°C en placas de Petri conteniendo algodón humedecido con agua destilada estéril, hasta que la radícula alcanzó una longitud de 2 cm.

9.1.2. Condiciones de cultivo de las plantas de maní.

Las semillas pregerminadas fueron transferidas a macetas conteniendo vermiculita estéril y llevadas a cámara de crecimiento con fotoperíodo de 18/6 hs (luz/oscuridad), temperatura de 26/19°C (día / noche), 50% de humedad relativa. Las plantas fueron regadas regularmente con H₂O corriente estéril y medio Hoagland sin nitrógeno (Hoagland y Arnon, 1950).

9.1.3. Inoculación de plántulas de maní con las cepas silvestre y mutante.

Luego de aproximadamente 6 días de crecimiento en invernáculo, las plántulas fueron inoculadas con 3 ml de la cepa mutante, de modo tal de obtener aproximadamente 1×10^8 ufc g⁻¹ de suelo. Las plantas controles fueron inoculadas con la cepa silvestre. Las mismas se mantuvieron en cámara de crecimiento durante 60 días. Se determinó porcentaje de plantas noduladas, PSA, contenido

de nitrógeno y número de nódulos totales, número de nódulos rojos. Nódulos seleccionados al azar fueron utilizados para (a) efectuar estudios histológicos y (b) corroborar la presencia de la mutante en los mismos mediante la amplificación de las secuencias de inserción IS50 del mTn5SSce/B31.

9.2. Determinación de la supervivencia de la mutante M1024.

Luego de 2, 25 y 50 días de incubación, la supervivencia de la mutante se determinó a partir de dos tipos de muestras: soporte inerte en el que crece la planta (arena volcánica no asociada con las raíces de las plantas de maní) y rizósfera (arena volcánica adherida a la superficie radical). Para el análisis de la primera de estas muestras, se resuspendió 1 g del soporte de las macetas en 1 ml de PBS y se dejó en agitación a 150 rpm durante 15 min. Se realizaron diluciones seriadas (1:10) en agua destilada estéril y se plaquearon en medio YEMA. Para obtener la muestra rizosférica, las raíces de las plantas fueron lavadas con PBS estéril durante 20 min y posteriormente esta solución se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min a 4°C. Un gramo del pellet obtenido fue diluido en forma seriada (1:10) y sembrado en placas con medio MM (con la adición de Sp 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cuando fue requerido), las que fueron posteriormente incubadas a 28°C en estufa hasta la aparición de las colonias (Van Dillewjin y col., 2001).

9.3. Determinación de la competitividad de la mutante alterada en la producción de EPSs.

Las cepas salvaje y mutante fueron cultivadas en medio YEM a 28°C hasta alcanzar una DO_{620} : 0.20 correspondiendo a una concentración de 1×10^5 ufc ml^{-1} . Plántulas de maní de 6 días de crecimiento se co-inocularon con volúmenes

iguales (3 ml) de cultivo y se llevaron a cámara de crecimiento hasta los 60 días postinoculación.

Para determinar la competitividad entre las dos cepas inoculadas se realizó una tinción histoquímica de los nódulos presentes en las raíces de las plantas (Arséne y col., 1994) luego de que las mismas se incubaron durante 1h a 70°C para suprimir la actividad β -galactosidasa endógena. Posteriormente se adicionó la solución de tinción que contiene el sustrato específico X-Gal (250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y las raíces se incubaron a 30°C durante 72 h. Dicha solución fue luego removida con varios lavados con agua destilada. En cada planta se determinó el número de nódulos azules, ocupados por la mutante M1024, y número de nódulos blancos ocupados por la cepa salvaje NET30.

9.4. Histología de nódulos.

9.4.1. Microscopía óptica.

Se realizó la histología de nódulos según la metodología descrita por Johansen, (1940).

9.4.2. Microscopía electrónica de transmisión.

Nódulos de las plantas de maní obtenidos a los 60 días postinoculación, fueron fijados en una solución de Glutaraldehído 2% en buffer fosfato de Sorensen (0.1 M) pH 7.2. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Microscopía Electrónica del Centro Regional de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Bahía Blanca (CRIBABB) donde se realizó una segunda fijación con Tetróxido de Osmio al 2% y se deshidrató con concentraciones crecientes de acetona (25%, 50%, 75% y tres veces 100%). Posteriormente, las muestras se infiltraron en resinas Spurr y se dejaron polimerizar toda la noche a 70°C. Se realizaron secciones ultrafinas con Ultramicrótomo LKB y cuchilla de diamante.

Las secciones de 800 Å fueron contrastadas según el método de Reynolds y observadas en un Microscopio de Transmisión marca JEOL a 80 KV.

9.5. Determinación del rol de los EPSs en la protección frente a mecanismos de defensa de las plantas.

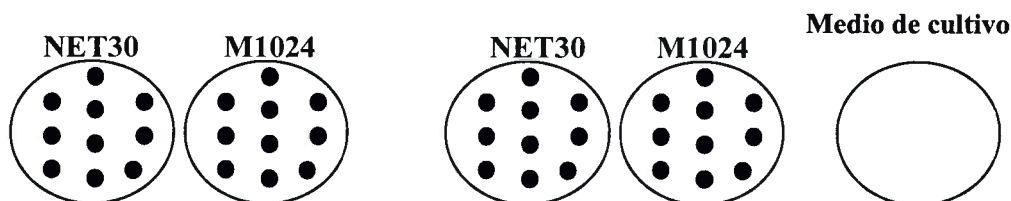
Siguiendo la metodología descrita por D'Haeze y col. (2004), colonias aisladas de las cepas silvestre y mutante fueron crecidas en placas conteniendo medio Harada hasta que alcanzaron un diámetro de 2-3 mm. Se adicionaron a cada colonia 2 l de una solución de H₂O₂ al 0.3% y se contó el número de burbujas desprendidas de la superficie de las mismas por la liberación de O₂ durante un minuto, utilizando un microscopio binocular Carl Zeiss. Paralelamente, a partir de las placas duplicado, mediante diluciones seriadas (1:10) se determinó el número de células viables en cada colonia. Se realizaron 5 ensayos independientes por duplicado, a partir de 10 colonias de cada cepa crecidas en las dos condiciones ensayadas. Los resultados se expresaron como N° burbujas x min⁻¹.

Se incluyeron además dos tratamientos controles:

- (i) se adicionaron 2 l de H₂O (en lugar de H₂O₂) a las colonias de las cepas parental y mutante, crecidas en ambas condiciones.
- (ii) se adicionaron 2 l de la solución de H₂O₂ 0.3% a placas conteniendo únicamente el medio de cultivo.

En el siguiente esquema se presenta en forma simplificada, la metodología utilizada.

2 l de H₂O₂ 0.3% por colonia 2 l de H₂O por colonia 2 l de H₂O₂ 0.3%



10. Análisis estadístico.

Se utilizó un diseño enteramente al azar. Se realizó un análisis de la varianza y las medias se contrastaron con el Test "t" de Student, con un nivel de significancia del 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Obtención de mutantes deficientes en la producción de EPS y/o β -glucanos cíclicos a partir de aislamientos nativos nodulantes de maní.

1.1. Obtención de mutantes deficientes en la producción de β - glucanos cíclicos.

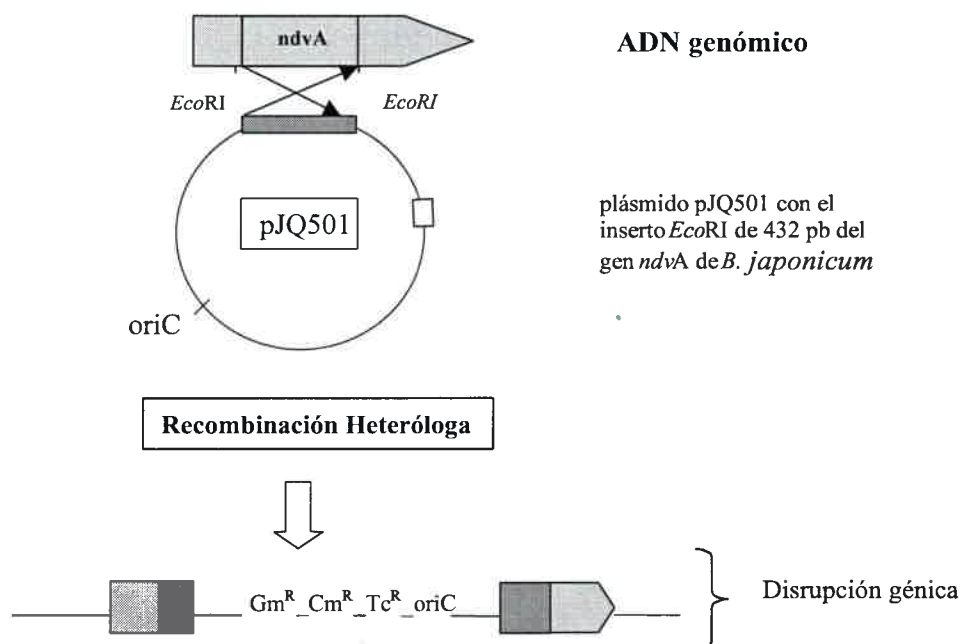
Para la obtención de mutantes deficientes en la producción de polisacáridos de superficie se utilizó el aislamiento nativo NET30, del que se disponía de información relevante referida a su caracterización fenotípica y genotípica, al momento de iniciar estos experimentos.

Con el objetivo de obtener a partir del aislamiento NET30 una mutante no productora de glucanos cíclicos, se realizó mutagénesis al azar utilizando el transposón mTn5*phoA*. Dado que la tasa de aparición de mutantes fue baja (sólo 150 colonias transconjugantes), se ensayó un protocolo de mutagénesis dirigida utilizando un fragmento interno *EcoRI* de 432 pb del gen *ndvA* de *B. japonicum* spc4. En la figura III-5 se ilustra el proceso de recombinación simple, a partir del cual se produce la integración del plásmido en el genoma de la bacteria. Los clones que resultan de la recombinación heteróloga *ndvA*⁻ se seleccionan considerando la resistencia a antibióticos que confiere el plásmido en placas de medio mínimo MM suplementadas con Tc (10 g ml⁻¹) y Gm (20 g ml⁻¹).

El ensayo se repitió 3 veces no obteniéndose, en ningún caso, colonias con el fenotipo esperado: Tc^R y Gm^R. Ello puede atribuirse a una baja homología del fragmento de 432 pb del gen *ndvA* de *B. japonicum* con el gen responsable de la biosíntesis de β -glucanos presente en el aislamiento de crecimiento rápido NET30 (que posee alta homología genómica con especies de *Rhizobium*), lo cual dificulta la posibilidad de que ocurra recombinación heteróloga. Si bien el plásmido pJQ501 ha sido utilizado por otros investigadores para mutagénesis dirigida (Müller y col., 1995), dado que en

nuestro sistema no se obtuvieron los resultados esperados, podría ser convenientemente reemplazado por los vectores movilizables pK18 o pK19 (Schäfer, 1994). Estos vectores sólo replican en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y promueven la disrupción génica luego de integrarse en el genoma de la bacteria receptora.

Figura III-5. Estrategia de recombinación simple utilizada.



Con el objetivo de ensayar una nueva estrategia para la obtención de mutantes deficientes en β -glucanos se procedió a diseñar cebadores que permitan la amplificación de una región interna del gen *ndvA* del aislamiento NET30, a fin de utilizarlo en futuros experimentos de mutagénesis específica. Para ello, se alinearon las secuencias de nucleótidos del gen *ndvA* de *S. meliloti*, *A. tumefaciens* y *M. loti* disponibles en el banco de datos. A partir de la secuencia consenso resultante, se diseñaron los cebadores G1 y G2, que permiten obtener un producto de amplificación de 1.06 Kb.

G1, cebador izquierdo: 5'GCGGGTTTCGGCGTCTT 3'

G2, cebador derecho: 5'CATCCTGGAACACCGTGGCCG 3'.

Utilizando estos cebadores se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 1.1 Kb a partir del genoma del aislamiento nativo NET30. El fragmento fue ligado al vector pCR2.1-TOPO Cloning (Invitrogen), resultando en el plásmido pCM11 con el que se transformaron posteriormente células competentes de *E. coli* DH5 α . Se seleccionó el clon #13-1 por presentar el fenotipo deseado: Lac⁻, Ap^R, Km^R. La presencia del fragmento de interés en este transconjugante fue corroborada por digestión del plásmido pCM11 con *Eco*RI y paralelamente, mediante la amplificación por PCR del fragmento clonado utilizando los cebadores G1 y G2 (figura III-6). Posteriormente, se secuenció el fragmento clonado usando los cebadores universales M13r y M13f (Macrogen Inc, Corea). El alineamiento de la secuencia no mostró homología con otras secuencias disponibles en el banco de datos, indicando que posiblemente se trate de un alelo diferente a los ya secuenciados.

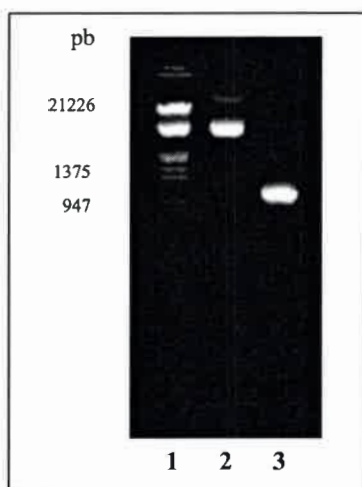


Figura III-6. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% del plásmido pCM11 extraído de *E. coli* #13-1. Calles: (1) marcador de PM E/H (0.12–21.2 Kb); (2) plásmido pCM11; (3) fragmento de 1100pb amplificado con los cebadores G1 y G2 a partir de pCM11.

En función de los resultados obtenidos, se decidió mutagenizar el gen *ndvB* el que se encuentra directamente involucrado en la biosíntesis de glucanos. Esta metodología fue ensayada en los aislamientos NET30 y NCHA22.

Los oligonucleótidos SMs (5'AGGACACAGGAGGTCGTGAC 3') y SMas (5' TCCTTGAGCACCAGCAGAC 3') fueron diseñados a partir de la secuencia disponible en el banco de datos del gen *ndvB* de *S. meliloti*.

Mediante el uso de estos cebadores se amplificó por PCR un banda del tamaño esperado (1.6 Kb) en el aislamiento nativo NET30, utilizando en la mezcla de reacción una alta concentración de $MgCl_2$ (6 mM) (figura III-7). En el aislamiento NCHA22 y empleando $MgCl_2$ 3 mM se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 1 Kb (figura III-8).

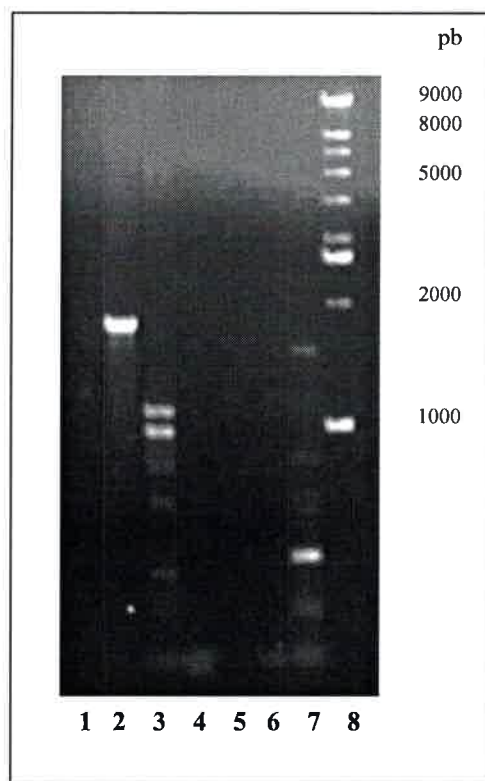


Figura III-7. Amplificación de un fragmento interno del gen *ndvB* de *S. meliloti* 102F34nal (1-3) y NET30 (5-7) con diferentes concentraciones de $MgCl_2$. Calles: (1 y 5) 1.5 mM $MgCl_2$; (2 y 6) 3 mM $MgCl_2$; (3 y 7) 6 mM $MgCl_2$; (4) control negativo. Calle 8: marcador de PM.

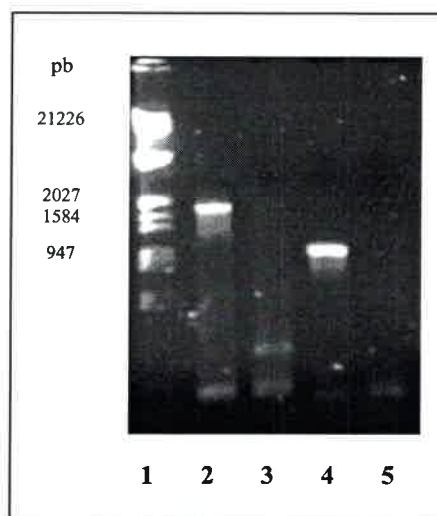


Figura III-8. Amplificación de un fragmento interno del gen *ndvB* de *S. meliloti* 102F34nal (calles 2 y 3) y NCHA22 (calle 4) con diferentes concentraciones de $MgCl_2$: (2 y 4) 3 mM $MgCl_2$; (3) 6 mM $MgCl_2$. Calles: (1) marcador de PM (0.12-21.2 Kb) (5) control negativo.

Los fragmentos obtenidos fueron purificados y posteriormente secuenciados. Dado que no se encontró homología entre las secuencias de los fragmentos amplificados a partir de NET30 y NCHA22 con el gen *ndvB* de otras especies rizobianas, se decidió ensayar una nueva estrategia. Para ello se empleó la mutante *S. meliloti* TY7 deficiente en la producción de glucanos cíclicos (Ielpi y col., 1990) que posee el gen *ndvB* interrumpido por inserción transposicional. El ADN genómico de esta mutante se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*, debido a que no existen sitios de corte para esta enzima en el transposón. Posteriormente se realizó una ligación con el vector pUC19 digerido con la misma endonucleasa de restricción y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Se seleccionó una colonia transformante por presentar el fenotipo Ap^R; Km^R y se corroboró en la misma la presencia del fragmento de interés en mediante digestión del plásmido pUC19::*ndvB*-Tn5 con *EcoRI*. Cuando se alineó la secuencia del fragmento clonado no se encontró homología con otras secuencias del gen *ndvB* disponibles en el banco de datos (tabla III-3).

Tabla III-3. Porcentaje de identidad del fragmento clonado con secuencias génicas disponibles en el banco de datos.

% Identidad	Proteína de función conocida	Nº de acceso
99	<i>S. meliloti</i> Rm1021: "pequeña molécula involucrada en la biosíntesis de histidina"	AL591782.1
88	<i>M. loti</i> MARF303099: "Subunidad de la Imidazol glicerol-fosfato sintasa ciclasa "	BA000012.4
83	<i>R. etli</i> : "gen <i>hisF</i> para imidazol glicerol fosfato sintasa."	AE008978.1

Estos resultados podrían atribuirse a que el sitio de corte de la enzima utilizada se encuentra muy alejado de la región de inserción del transposón en el genoma de la mutante TY7 y, por lo tanto, la secuencia obtenida podría corresponder a un gen adyacente al gen *ndvB*. Dado que *EcoRI* es la única enzima de corte frecuente que no posee sitios de reconocimiento en el Tn5, no fue posible ensayar nuevas digestiones para la obtención de fragmentos de menor tamaño.

La obtención de un mutante deficiente en la producción de α -glucanos cíclicos a partir de microsimbiontes de maní se intentó empleando diferentes estrategias de mutagénesis dirigida y al azar. Así, se utilizaron distintos rizobios nodulantes de maní (NCHA22, NET30) y se intentaron clonar dos genes diferentes (*ndvA* o *ndvB*) involucrados en la síntesis de este polisacárido, para su utilización en experimentos de mutagénesis dirigida. Sin embargo, en ninguno de los ensayos realizados fue posible amplificar dichos genes. Es posible que al igual que lo descrito para el gen *ndvB* en *B. japonicum*, los genes aquí analizados no estén presentes en el genoma de NCHA22 y NET30. Otra posible explicación es que, contrariamente a lo esperado, las secuencias de dichos genes en los aislamientos ensayados muestren escasa homología con las descritas para otras especies rizobianas, a partir de las cuales se diseñaron los cebadores. La posibilidad de disponer de las secuencias de los genes que se desean mutagenizar, constituye una herramienta de suma utilidad para la obtención de cepas mutantes. Para rizobios nodulantes de maní sólo se encuentra disponible en el banco de datos la secuencia de 260 pb del gen *16S ARNr*. No obstante ello, sería importante avanzar en la obtención de

mutantes deficientes en la producción de glucanos cíclicos a partir de aislamientos nativos de maní empleando otras estrategias alternativas. Una de ellas podría consistir en el diseño de sondas específicas a partir de fragmentos internos correspondientes a regiones altamente conservadas del gen *ndvB* de *S. meliloti*, cuyo genoma se ha secuenciado completamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De este modo, la utilización de sondas correspondientes a fragmentos génicos de 500 a 900 pb aumentaría la probabilidad de detectar la presencia del gen salvaje en el genoma de NET30 o NCHA22, mediante hibridación tipo Southern Blot. Finalmente, empleando herramientas de biología molecular, el gen identificado podría interrumpirse con un cassette de resistencia a antibiótico con el objetivo de utilizar la construcción resultante en futuros experimentos de mutagénesis dirigida.

1.2. Obtención e identificación de mutantes deficientes en la producción exopolisacáridos.

Con el objetivo de obtener mutantes deficientes en la producción de EPSs, se realizó una mutagénesis al azar del aislamiento nativo NET30 por conjugación biparental con la cepa *E. coli* S17-1 donadora del mTn5SSce/B31 (Figura III-9). Luego de 3 ensayos de conjugación se obtuvieron 2400 transconjugantes resistentes a Sp ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$).

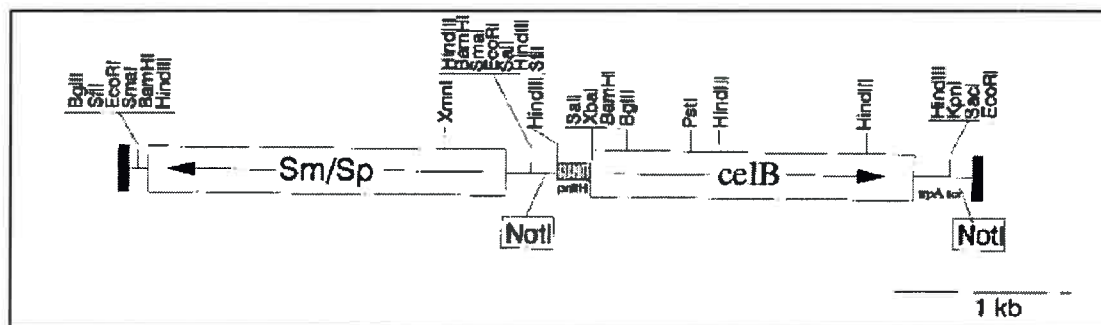


Figura III-9. Mapa físico y genético del transposón mTn5SSce/B31

Para identificar posibles mutantes alteradas en la producción de polisacáridos extracelulares, los 2400 transconjugantes portadores del transposón mTn5SSce/B31 fueron analizados mediante tinción con Sudan Black B (SBB). Esta técnica permite detectar en *S. meliloti* deficiencias cuantitativas y cualitativas tanto del EPS I como del EPS II. El SBB es un colorante lipofílico cuya incorporación a las células es reducida por la presencia en su superficie de EPSs, por lo que las colonias productoras de estas moléculas permanecen sin teñirse, diferenciándose de mutantes deficientes en la producción de EPSs que al incorporar el colorante se observan de color negro azulado.

Una posible mutante EPS⁻ (correspondiente al clon M1024) fue seleccionada por presentar el siguiente fenotipo: colonias no mucosas en placas de medio mínimo MM1, Sp^R e incorporación del colorante Sudan Black B cuando creció en los medios MM1 y Harada (figura III-10).



Figura III-10. Colonias de M1024 crecidas en medio mínimo MM1 teñidas con Sudan Black B.

2. Caracterización fenotípica de la mutante deficiente en la producción de exopolisacáridos.

2.1. Evaluación del crecimiento de la mutante M1024 en medios con diferentes fuentes carbonadas.

Los rizobios utilizan diferentes fuentes de C para su metabolismo tales como manitol, glucosa, gluconato, sacarosa, galactosa, maltosa y ácidos orgánicos.

El crecimiento de la mutante M1024 y la cepa salvaje NET30 fue evaluado en medio mínimo MM con Manitol o Galactosa (10 g l^{-1}) como fuente carbonada. Ambas cepas presentaron un comportamiento comparable en presencia de Manitol como fuente carbonada (tiempo de generación de 2.58 h y 2.53 h, respectivamente) (figura III-11), lo que permitiría inferir que la inserción del mTn5SSce/B31 no afectó el metabolismo general de la bacteria.

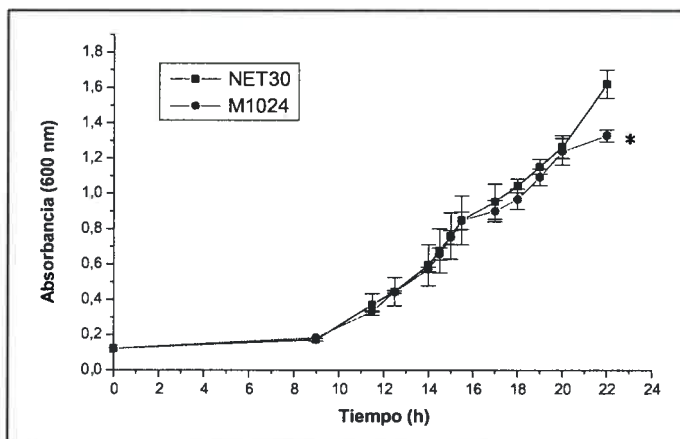


Figura III-11. Curva de crecimiento de NET30 y de la mutante M1024 en medio mínimo MM (Manitol). Los datos representan la media \pm el error estándar de tres determinaciones ($n=3$); (*) $p<0.05$.

En medio mínimo con Galactosa se observó un leve aunque significativo retraso en el crecimiento de la mutante M1024 (figura III-12). Los tiempos de generación correspondieron a 3.35 h y 3.38 h para las cepas silvestre y

mutante, respectivamente. Considerando estos resultados, la extracción de EPSs se realizó a partir de cultivos que hayan alcanzado la misma DO_{600} en tiempos iguales descartando a la galactosa como fuente carbonada del medio.

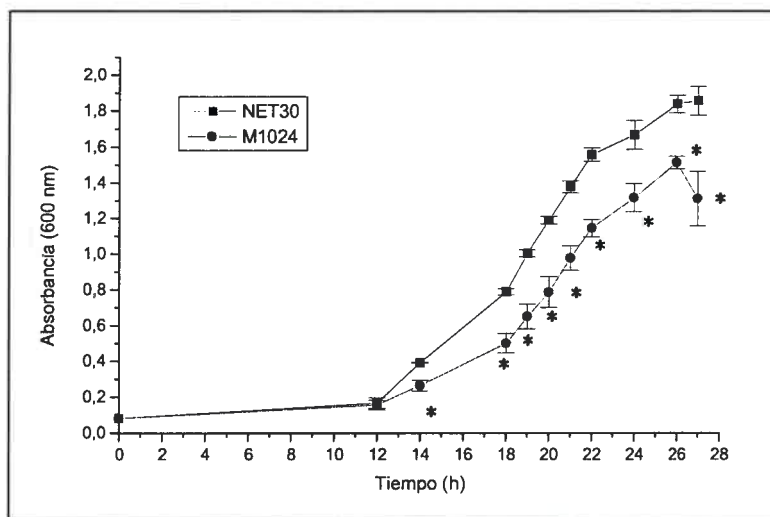


Figura III-12. Curva de crecimiento de NET30 y de la mutante M1024 en medio mínimo MM (Galactosa). Los datos representan la media \pm el error estándar de tres determinaciones ($n=3$). (*) $p < 0.05$.

2.2. Contenido de EPSs de la mutante M1024 .

La biosíntesis de polisacáridos de la superficie microbiana está mediada por un conjunto de reacciones tempranas y tardías. En las etapas tempranas se produce la conversión de la fuente carbonada en el precursor activado (UDP-glucosa). Estas reacciones se desarrollan en forma cíclica mediante las rutas de Entner-Doudoroff y la vía de las pentosas-fosfato. En las reacciones tardías los precursores metabólicos son polimerizados para formar la unidad estructural repetitiva que posteriormente será ensamblada en el periplasma y exportada al medio extracelular (Portaris y col., 1999).

Por otra parte, la biosíntesis de polímeros extracelulares (EPSs, KPSs) depende de la naturaleza de la fuente carbonada y de la relación C/N del medio de cultivo. Se ha descrito que en medios sin limitación de nitrógeno, se sintetizan elevados niveles de EPSs durante la fase exponencial de crecimiento (Law y col., 1982; Mort y Bauer, 1980).

El contenido de EPSs de las cepas silvestre NET30 y mutante M1024 fue evaluado en cultivos en fase exponencial tardía obtenidos en los siguientes medios: a) YEM (Manitol 10 g l⁻¹), b) MM1 (Fructosa 1 g l⁻¹) y c) Harada (Glucosa 2.5 g l⁻¹). Estos compuestos carbonados fueron seleccionados debido a que estudios previos demuestran la capacidad de los rizobios para utilizarlos como fuente de carbono durante su crecimiento (Vincent y col., 1970; Breedveld y col., 1993; Tavernier y col., 1997; Tavernier y col., 1998).

La menor producción de EPSs de NET30 en medios suplementados con Glucosa como fuente de carbono, en comparación con aquellos que contienen Manitol o Fructosa (Tabla III-4), coincide con lo informado por Tavernier y col. (1997) para las cepas de *S. meliloti* M5N1 y Su47. Estos autores adjudican dicha diferencia a que previo a su participación en la biosíntesis de polisacáridos, la glucosa es convertida extracelularmente en ácido glucónico o 2-cetoglucónico y luego en 6-fosfogluconato por una reacción irreversible catalizada por la enzima glucosa-6P-deshidrogenasa (Portaris y col., 1999). Por el contrario, el azúcar fructosa es incorporado a la célula sin previa transformación (Patel y col., 1974; Garret y Grisham, 1995).

En la mutante M1024 se determinó una disminución del 43% y 54% en el contenido de EPSs secretados en relación con la cepa silvestre, cuando las fuentes de carbono fueron Fructosa o Glucosa, respectivamente, y del 27% en presencia de Manitol (Tabla III-4). Estos resultados confirman que la producción de exopolisacáridos está cuantitativamente afectada en la mutante M1024.

Tabla III-4. Contenido de EPSs en bacterias cultivadas en medios con distintas fuentes carbonadas.

CONTENIDO DE EPSs (mg hexosas/mg proteínas)			
Bacteria	Medio y Fuente de carbono		
	YEM (Manitol 10 g/l)	MM1 (Fructosa 1 g/l)	Harada (Glucosa 2.5 g/l)
NET30	1.11 ± 0.16	1.18 ± 0.23	0.56 ± 0.24
M1024	0.81 ± 0.23*	0.67 ± 0.18 *	0.26 ± 0.04 *

Los valores corresponden al promedio ± el ES de tres determinaciones (n=3)

* Diferencias significativas con NET30 (p< 0.05)

2.3. Composición de azúcares de los EPSs sintetizados por la mutante M1024.

Se ha descrito que los EPSs rizobianos son heteropolímeros complejos constituidos por unidades repetidas de siete a nueve hexosas, siendo los principales monómeros moléculas de D-Galactosa y D-Glucosa.

El análisis mediante GLC de los EPSs producidos por NET30 y M1024, permitió conocer su composición de azúcares, hasta ahora no estudiada en microsimbiontes de maní. Se determinó la presencia de D- Arabinosa, D- Galactosa y D-Glucosa, siendo esta última el azúcar que se encuentra en mayor proporción (Tabla III-5). La presencia de Arabinosa en EPSs rizobianos también ha sido informada para un aislamiento nativo de *S. meliloti* (Janecka y col., 2002).

Si bien no se encontraron diferencias en los azúcares constituyentes de los EPSs de las cepas salvaje y mutante, en esta última se observó una disminución significativa del 54% en el contenido de Galactosa (Tabla III-5). Ello indica que no sólo la cantidad de EPSs sintetizados está afectada en la mutante sino también su composición cualitativa de azúcares.

Tabla III-5. Carbohidratos identificados por GLC en EPSs de las cepas silvestre y mutante M1024.

% relativos de carbohidratos		
Azúcar (TR)	NET30	M1024
Arabinosa (6.988)	18.2	17.6
Galactosa (13.296)	18.5	8.4
Glucosa (14.698)	63.3	74.0

Los datos corresponden a tres determinaciones independientes (n=3)
TR: tiempo de retención.

La disminución cualitativa de azúcares en la molécula polisacárida de la mutante fue confirmada mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-SM) previa derivatización por trimetilsilil (TMS) (Dpto. Química, Universidad de Sevilla, España). Actualmente, se está analizando por 1-D ^1H resonancia magnética nuclear (RMN) la estructura general de la molécula polisacárida producida por estas cepas.

2.4. Biosíntesis de β -glucanos cíclicos y lipopolisacáridos (LPSs) en la mutante M1024.

Los rizobios acumulan diferentes polisacáridos de superficie como EPSs, LPSs y glucanos cíclicos. Si bien estos polisacáridos difieren en la localización celular, sus vías biosintéticas se encuentran bajo la expresión y regulación de genes comunes (Portaris y col., 1999). Con el fin de descartar alteraciones en la biosíntesis de LPSs y β - glucanos cíclicos como consecuencia de la inserción del mTn5SSce/B31 en el genoma de la mutante M1024 afectada en la producción de EPSs, se decidió estudiar cualitativamente dichos carbohidratos de superficie.

El perfil cromatográfico obtenido a partir del extracto de glucanos cíclicos (figura III-13) así como el perfil electroforético de los LPSs de la mutante M1024 (figura III-14) no revelaron diferencias entre las cepas salvaje y mutante.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la deficiencia en la síntesis de EPSs de la mutante transposicional M1024, no estaría acompañada por cambios en la composición de otros polisacáridos de superficie como LPSs y β -glucanos cíclicos.

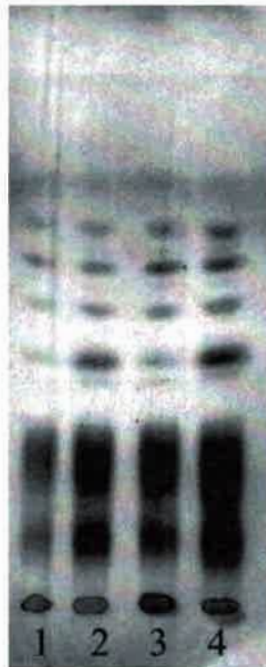


Figura III-13. TLC de β -glucanos cíclicos de las cepas silvestre y mutante. Calles 1 y 3: NET 30 (Volumen de siembra: 10 μ l y 20 μ l, respectivamente) calles 2 y 4: mutante M1024 (Volumen de siembra: 10 y 20 μ l respectivamente).



Figura III-14. Perfil de LPSs en gel de SDS-poliacrilamida 20%. Calles: (1) NET30; (2) M1024.

3. Caracterización genotípica de la mutante M1024.

La técnica conocida como REP-PCR se basa en la utilización de cebadores complementarios a secuencias de ADN repetitivas y altamente conservadas, presentes en múltiples copias en el genoma de muchas bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas (Lupski y Weinstock, 1992). Estas secuencias han sido identificadas y corresponden a secuencias consenso extragénicas palindrómicas repetitivas REP de 35-40 pb localizadas en distintas regiones del genoma (Versalovic y col, 1994). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de distintas regiones génicas localizadas entre los elementos REP, que posteriormente se resuelven por electroforesis en geles de agarosa, resultando en un perfil de bandas característico para cada cepa referido como fingerprint genómico REP-PCR.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de esta técnica permitieron confirmar que la mutante M1024 es un clon derivado del aislamiento nativo NET30, dado que ambas mostraron el mismo perfil REP-PCR (figura III-15).



Figura III-15. ERIC-fingerprint genómico de la cepa silvestre NET30 y la mutante M1024. Calles: (1-2) NET30; (3-4) M1024; (5) control negativo.

Por otra parte, se realizó una amplificación mediante PCR de las secuencias de inserción IS50R e IS50L del mTn5SSce/B31, según se detalla en Materiales y Métodos. De acuerdo a lo esperado, la señal de amplificación (1200 pb) sólo se observó en la mutante M1024, indicando la presencia del transposón en su genoma (Figura III-16).



Figura III-16. Amplificación de las secuencias de inserción IS50 del mTn5SSce/B31. Calles: (1) marcador de PM (0.12-21.2 Kb); (2-3) M1024; (4) control positivo (pAS131); (5) NET30; (6) control negativo.

Con el fin de comprobar la presencia de una única inserción del transposón en el genoma de la mutante alterada en la producción de EPSs, se realizó un ensayo de hibridación del ADN genómico de la mutante M1024 empleando como sonda el fragmento *PnifH-ce/B* de 2.8 kb del mTn5SSce/B31 (Sonda C*). La aparición de bandas inespecíficas, indujo a ensayar nuevas sondas, para lo cual el plásmido pAS131 se digirió con la enzima de restricción *SmaI*. De este modo se obtuvo una sonda de 1.5 Kb a partir del fragmento correspondiente al cassette de Sm/Sp (Sonda S*), la que fue utilizada en el análisis de Southern Blot (servicio realizado en la cátedra de Biotecnología y Biología Molecular, de la Universidad Nacional de Quilmes). Mediante esta metodología se identificaron dos señales de hibridación correspondientes a fragmentos mayores a 20 kb del genoma de la mutante (figura III-17).

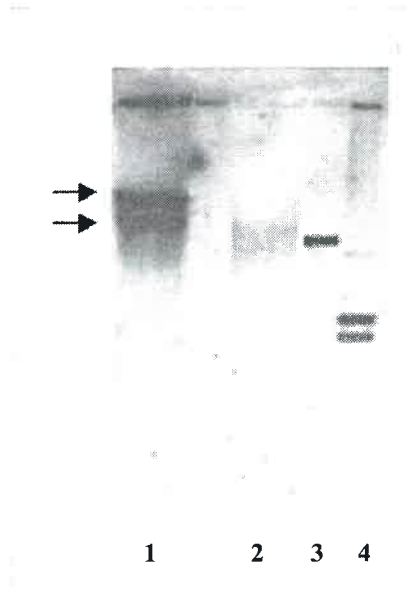


Figura III-17. Hibridación de ADN de las cepas silvestre y mutante utilizando la sonda S*. Calles: (1) ADN de M1024 digerido con *Stu*I; (2) ADN de NET30 digerido con *Stu*I; (3) Marcador de PM E/H; (4) pAS131/ *Eco*RI.

Dado que los estudios fenotípicos realizados en la mutante M1024 indicaron que no existen alteraciones en el patrón de crecimiento, lo que permite descartar que se encuentren afectados genes del metabolismo general de la bacteria, ni en la producción de otros polisacáridos de superficie (LPSs y β -glucanos), se podría concluir que la inserción del mTn5SSce/B31 afectaría sólo la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de EPSs.

Con el objetivo de conocer la localización del mTn5SSce/B31 en el genoma de la mutante y, de este modo, obtener una correlación precisa entre los genes interrumpidos y el fenotipo deficiente en la producción de EPSs de la misma, se realizaron varios intentos de clonado de los fragmentos digeridos con las enzimas *Not*I o *Stu*I en vectores específicos. Probablemente debido al elevado peso molecular de los fragmentos de restricción obtenidos no fue posible su clonación. Esta dificultad para el clonado de genes de mutantes EPS⁻ también fue reportada por Janezarek y Skorupska (2003) en un trabajo realizado con el objetivo de estudiar la localización del sitio de inserción del Tn5

en 14 mutantes transposicionales de *R. leguminosarum* bv *trifolii*. La posibilidad de ensayar nuevas digestiones con otras enzimas de restricción que poseen sitios frecuentes de reconocimiento en los genomas bacterianos fue descartada debido a que las mismas poseen también varios sitios de corte en el mTn5SSce/B31. Se propone alternativamente, intentar en el futuro clonar estos fragmentos en el cósmido SuperCos-1 (Stratagene) y transformar células de *E. coli*. Las bacterias transformantes podrán ser identificadas por la resistencia al antibiótico conferida por el cósmido (Nm y Ap) y por el mTn5SSce/B31 (Sp).

4. Comportamiento simbiótico de la mutante M1024.

Durante las etapas tempranas de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa, los EPSs bacterianos juegan un importante papel en la adsorción de los rizobios a la superficie radical y en el posterior desarrollo de hilos de infección. Mutantes defectivas en la producción de EPSs inducen nódulos vacíos, no fijadores de nitrógeno en leguminosas que son infectadas por formación de hilos de infección y que desarrollan nódulos indeterminados (Becker y Pühler, 1998; Skorupska y col., 1995; van Workum y vol., 1997) o determinados (Kosch y col., 1994; Eggleston y col., 1996).

A. hypogaea L. (maní) difiere de otras leguminosas en que la infección a través de la epidermis involucra una penetración por "crack entry", colonización del córtex radical por invasión de espacios intercelulares y luego penetración intracelular. De este modo, las bacterias no siguen el camino célula-célula a través de la formación de hilos de infección.

La mutante transposicional M1024 posee deficiencias cuantitativas y cualitativas en la producción de EPSs, las que podrían afectar el establecimiento de simbiosis efectivas en plantas de maní. En este trabajo de tesis se estudió el posible rol de los EPSs rizobianos en el proceso de infección por "crack entry" que ocurre en maní, el cual no está mediado por la formación de hilos de infección.

4.1. Capacidad de nodular maní.

Con el fin de estudiar si la alteración en la producción de EPSs afecta la capacidad de la mutante de nodular maní, plántulas de 7 días de crecimiento fueron inoculadas con suspensiones bacterianas en PBS provenientes de cultivos de la mutante en medio YEM o medio MM1 (conteniendo Manitol o Fructosa como fuente de carbono, respectivamente). Luego de 60 días de incubación en invernáculo, las plantas fueron cosechadas y se determinó el porcentaje de plantas noduladas, número de nódulos totales, peso seco de nódulos, peso seco y contenido de N de la parte aérea.

Se observó una reducción significativa (48%) en el número de nódulos totales de plantas inoculadas con la mutante M1024 cultivada en medio rico con Manitol. Los nódulos desarrollados en estas plantas probablemente presentaron un mayor desarrollo de tejido fijador debido a que el peso seco de los mismos fue similar al de los nódulos de plantas inoculadas con la cepa silvestre. El peso seco aéreo de leguminosas inoculadas proporciona un índice de la eficacia en la FBN del rizobio en interacción con su huésped. La reducción significativa del PSA de las plantas (27%) y de su contenido de N (23%) constituyen evidencias de la reducida capacidad de M1024 para nodular maní (Tabla III-6).

Tabla III-6. Comportamiento simbiótico de la mutante M1024 cultivada en YEM (Manitol 10 g l⁻¹).

Tratamiento	Parámetros simbióticos			Parámetros Agronómicos	
	% plantas Noduladas	Nº nódulos/planta	PSN (mg)	PSA (g)	Nitrógeno (mg/planta)
NET30	100	27 ± 3	40.2 ± 9	1.10 ± 0.09 ^c	34.57 ± 2.54 ^c
M1024	92	14 ± 4 ^b	40.3 ± 11	0.80 ± 0.08 ^b	26.63 ± 3.38 ^{b,c}
Control (-)	-	-	-	0.89 ± 0.09	19.95 ± 1.38

Los datos representan la media ± el error estándar, n =16
^b Diferencias significativas con NET30 (p<0.05)
^c Diferencias significativas con plantas controles sin inocular (p <0.05)
 PSN: peso seco de nódulos, PSA: peso seco aéreo

La inoculación de plántulas de maní con cultivos de la mutante en medio conteniendo Fructosa, en el cual la producción de EPSs fue significativamente menor (disminución del 43%) que en el medio con Manitol, reveló alteraciones aún más severas en el fenotipo simbiótico de M1024, entre las que se destaca el escaso número de plantas noduladas (Tabla III-7).

Tabla III-7. Comportamiento simbiótico de la mutante M1024 cultivada en MM1 (Fructosa 1 g l⁻¹).

Tratamiento	Parámetros simbióticos			Parámetros Agronómicos	
	% Plantas Noduladas	Nº nódulos/planta	PSN (mg)	PSA (g)	Nitrógeno (mg/planta)
NET30	100	42 ± 10	13.5 ± 1.1	0.79 ± 0.02 ^c	28.98 ± 0.98 ^c
M1024	25	2 ± 1 ^b	5.0 ± 0.9 ^b	0.60 ± 0.08 ^b	21.34 ± 1.71 ^b
Control (-)	-	-	-	0.65 ± 0.08	19.98 ± 1.21

Los datos representan la media ± el error estándar de tres determinaciones para NET30 y ocho determinaciones para M1024.
^b Diferencias significativas con NET30 (p<0.05)
^c Diferencias significativas con plantas controles sin inocular (p <0.05)
 PSN: peso seco de nódulos, PSA: peso seco aéreo

La disminución significativa del 27% en el contenido de nitrógeno y del 24% en el PSA de las plantas inoculadas con la mutante, se relaciona con la reducción significativa del 95% en el número de nódulos totales formados y del 63% en el PSN. El PSA y el contenido de nitrógeno de las plantas inoculadas con M1024 no difirió del obtenido en plantas sin inocular (control negativo), lo que demuestra una marcada deficiencia en la capacidad para fijar nitrógeno de la mutante cuando es cultivada con Fructosa o con Manitol como fuente de carbono.

Por otra parte se comprobó que los nódulos de las plantas inoculadas con M1024 están ocupados por esta mutante, ya que las bacterias que de ellos se aislaron fueron capaces de crecer en medio YEMA suplementado con el antibiótico Sp (80 g ml⁻¹). Además fue posible amplificar, a partir del ADN de las bacterias obtenidas de los nódulos, las secuencias IS50 del mTn5SSce/B31

(figura III-18). Ello además indica que la inserción del transposón es estable luego de 60 días post-inoculación.

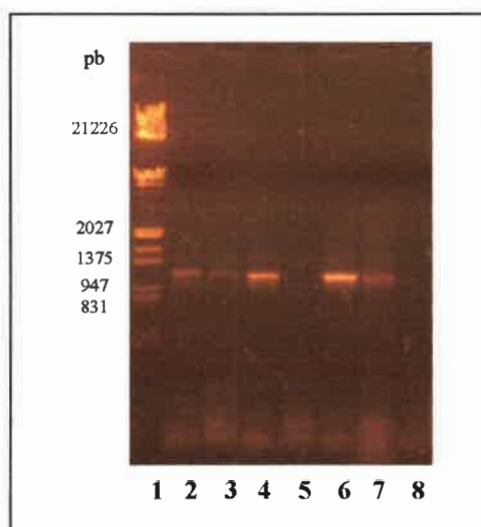


Figura III-18. Amplificación de las secuencias IS50 del mTn5SSce/B31. Calles: (1) marcador de PM (0.12-21.2 Kb); (2-4) aislamientos de nódulos de plantas inoculadas con M1024; (5) NET30; (6) Control positivo (pAS131); (7) M1024; (8) Control negativo

Numerosas investigaciones se desarrollaron con el fin de evaluar el rol de los EPSs en el establecimiento de simbiosis efectivas utilizando mutantes que, como la cepa M1024, muestran un fenotipo productor de reducidas cantidades de EPSs (Becker and Pühler, 1998; Leigh and Walker, 1994; Borthakur et al., 1986; Mazur et al., 2002, etc). En trabajos realizados por Wielbo y col. (2004), mutantes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 incapaces de sintetizar EPSs (RtP22) o que producen menores cantidades de estos polímeros (RtP20 y RtP23) fueron inoculadas a plantas de trébol (*T. pratense* cv Ulka). La mutante RtP22 mostró un fenotipo Fix⁻, mientras que las mutantes RtP20 y RtP23, aún cuando presentaron un fenotipo Fix⁺, formaron un escaso número de nódulos con reducida cantidad de bacteroides. Kaufusi y col. (2004) atribuyeron a la reducida cantidad de EPSs sintetizados por la mutante *Rhizobium* sp. TAL1145 RUH102 (disminución del 82%), el escaso número de nódulos formados y el menor contenido de nitrógeno de plantas de *Leucaena leucocephala* inoculadas con dicha mutante.

4.2. Supervivencia de la mutante M1024.

Además del rol activo de los EPSs en el establecimiento de simbiosis efectivas de los rizobios con las leguminosas, éstos desempeñan funciones importantes durante la permanencia de las bacterias en el suelo. En este sentido, los EPSs permiten a las bacterias adherirse a diferentes superficies o captar nutrientes. Por otra parte, protegen a los rizobios de la actividad de diversas sustancias antimicrobianas presentes en el suelo y de diferentes condiciones de estrés ambiental (Frayse y col., 2003).

Debido a que la mutante M1024 produce cantidades reducidas de EPSs podría estar afectada su supervivencia en el soporte inerte de las macetas en las que se desarrollan las plantas inoculadas. Sin embargo, los recuentos obtenidos de M1024 y de la cepa parental fueron similares tanto en el soporte inerte no asociado a raíces así como en la rizósfera a los 2 y 25 días post – inoculación, observándose una leve aunque significativa disminución del número de células viables de M1024 a los 50 días de inoculación (Figura III-19). Estos resultados podrían indicar que los EPSs participarían en la protección de los rizobios en condiciones de vida libre.

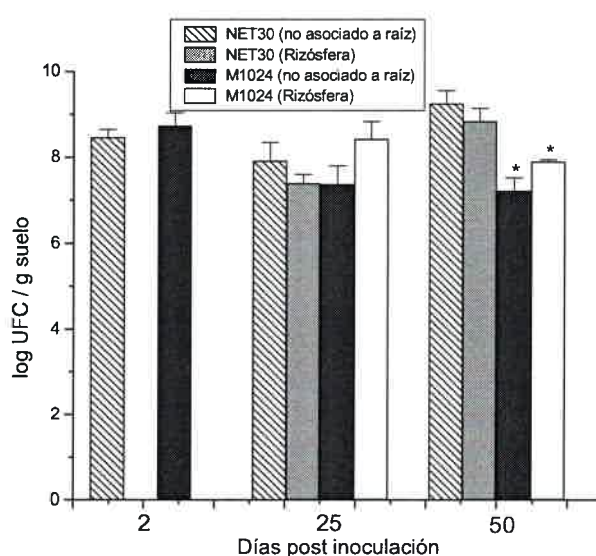


Figura III-19. Supervivencia de las cepas silvestre y mutante. Los valores promedio y el error estándar fueron obtenidos a partir de tres determinaciones independientes (n=3), (*) p<0.05.

Estudios de cinética de nodulación de maní realizados en nuestro laboratorio demostraron que la formación de nódulos ocurre aproximadamente a los 20 días post-inoculación (Angelini y col., 2005). De este modo, la disminución en el número de células viables de M1024 observada a partir de los 50 días post inoculación no afectaría el proceso de nodulación de las plantas en las condiciones de los ensayos aquí realizados. Se concluye entonces, que las deficiencias encontradas en el comportamiento simbiótico de la mutante no podrían ser atribuidas a una disminución en su capacidad de supervivencia.

4.3. Competencia de la mutante alterada en la producción de EPSs.

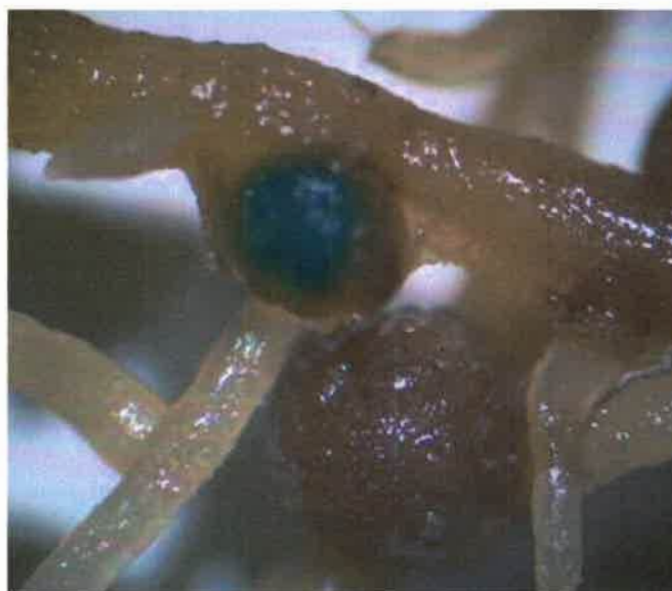
El término “competencia” hace referencia a la capacidad diferencial de distintas cepas rizobianas para formar nódulos en su leguminosa huésped cuando se encuentran en un mismo ambiente. Así, la competencia puede presentarse en diferentes niveles: las bacterias compiten por la supervivencia y multiplicación en la rizósfera, por sitios de infección accesibles en las raíces, o bien, dado a que no todas las infecciones primarias inducen la formación de nódulos, probablemente exista competencia aún durante el desarrollo de los nódulos (Simon y col., 1996).

Para evaluar la capacidad competitiva de la mutante M1024 en la nodulación, plántulas de maní fueron coinoculadas con cultivos de las cepas silvestre y mutante en una proporción 1:1. Las raíces noduladas fueron sumergidas en una solución conteniendo el sustrato X-Gal (250 g ml⁻¹). Debido a que el gen *ce/B* presente en el mTn5SSce/B31 se encuentra bajo el control del promotor *nifH* (que sólo es activo en nódulos fijadores de nitrógeno) se asume que los nódulos que muestran un color azul luego de dicho tratamiento están ocupados por la mutante M1024 y son activos en la FBN. Se encontró una alta proporción (95%) de nódulos blancos probablemente ocupados por la cepa silvestre, sugiriendo que la competitividad para la ocupancia de nódulos en la mutante se encuentra severamente afectada (Tabla III-8 y Figura III-20).

Tabla III-8. Competitividad de la mutante M1024 en la nodulación de maní.

Nódulos Totales por planta	% de Nódulos por planta ocupados por NET30	% de Nódulos por planta ocupados por M1024
40 ± 2	95	5

(n=8).

**Figura III-20.** Competitividad para la ocupación de nódulos en maní. Los nódulos azules se encuentran ocupados por la mutante M1024 y los nódulos blancos por la cepa silvestre NET30.

Si bien se asume que las mutantes transposicionales poseen una menor habilidad competitiva para ocupar nódulos respecto de su cepa silvestre, algunos investigadores encontraron que la inserción en el genoma de transposones derivados del *mTn5ce/B* y *mTn5gusA* no provoca efectos intrínsecos en la capacidad competitiva de las bacterias ni tampoco afecta sus propiedades simbióticas (Sharma y col., 1991; Streit y col., 1992; Sessitsch y col., 1997).

La mutante M1024 presentó un crecimiento similar al de la cepa silvestre en medio mínimo MM Manitol (Figura III-11) y una adecuada supervivencia en

el soporte no asociado a raíces y rizósfera (Figura III-19). La aparente habilidad de la cepa silvestre para desplazar a la mutante en la ocupancia de los nódulos estaría entonces relacionada con una producción normal de EPSs, los que probablemente le confieren una ventaja competitiva durante las primeras etapas del desarrollo de los nódulos. Posiblemente estas moléculas le permitan a la bacteria adherirse a la superficie del pelo radical, o bien la protejan frente a los mecanismos de defensa desencadenados en las plantas como consecuencia de la infección rizobiana. Esta última posibilidad fue evaluada en este trabajo de tesis y los resultados obtenidos se presentan más adelante.

4.4. Características histológicas de los nódulos desarrollados por la mutante M1024.

Se realizó una tinción histológica de nódulos seleccionados al azar provenientes de plantas inoculadas con cultivos en medio YEM de la cepa silvestre o mutante.

La observación al microscopio óptico de los nódulos desarrollados en maní tanto por el aislamiento nativo NET30 (figuras III-21A y III-21B) como por la mutante M1024 (figuras III-21C y III-21D), reveló la morfología típica de nódulos determinados. En ambos se observan 2 zonas principales: central y periférica. La región central contiene células aparentemente infectadas, y la periférica incluye la corteza nodular, cuyas células poseen gran cantidad de amiloplastos, haces vasculares y una cubierta más externa o capa protectora, que contiene células suberificadas (nódulos maduros).

Si bien no se encontraron alteraciones morfológicas en los nódulos desarrollados por la mutante M1024 en relación con los formados por la cepa silvestre, la microscopía óptica no permite identificar en su interior la presencia de bacterias diferenciadas en bacteroides. En este sentido, Cermola y col. (2000) informaron que aún cuando la microscopía óptica de nódulos desarrollados por mutantes *Nif⁻* de *R. etli* presentaron una organización histológica normal, su observación mediante microscopía electrónica reveló un proceso deficiente de diferenciación de los simbiosomas, mostrando los

bacteroides formas irregulares, un citoplasma más reducido y en algunos casos signos de autólisis.

Teniendo en consideración estos antecedentes, se decidió determinar mediante microscopía electrónica (MET), posibles alteraciones en la ultraestructura de los nódulos obtenidos en plantas inoculadas con M1024.

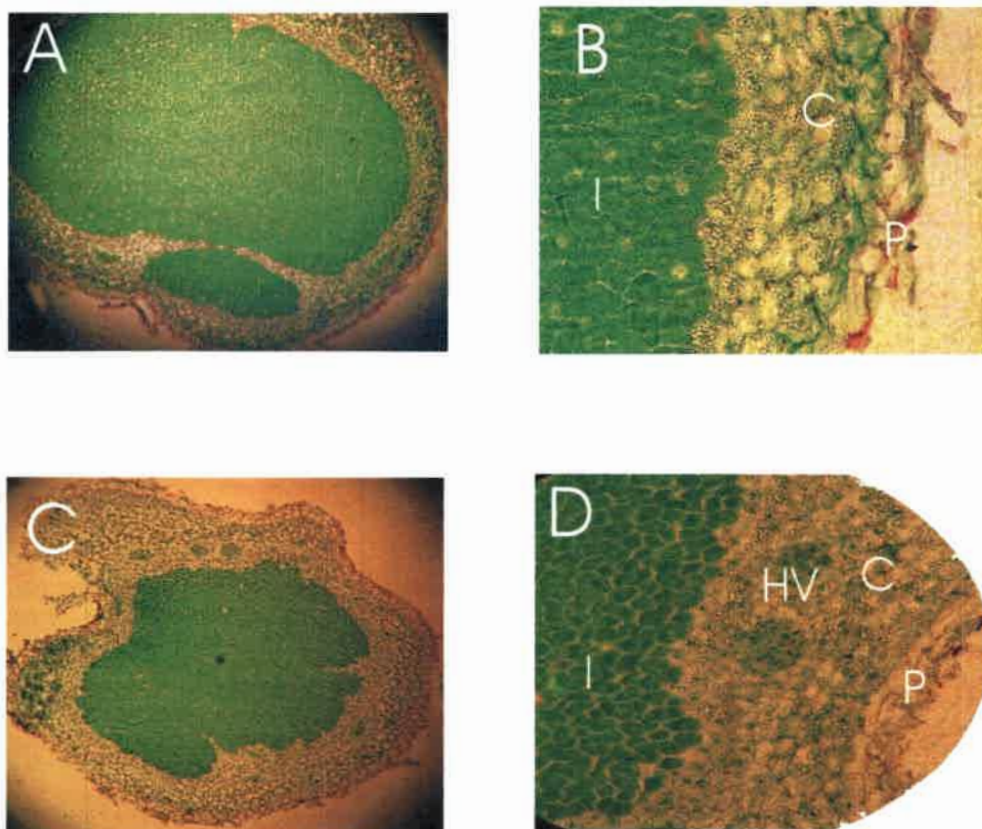


Figura III-21. Microscopía óptica de cortes transversales de nódulos provenientes de plantas inoculadas con NET30 (A y B) y nódulos provenientes de plantas inoculadas con M1024 (C y D). Abreviaturas: (P) peridermis; (I) zona de infección; (HV) haces vasculares; (C) córtex. 400X.

Para ello se seleccionaron nódulos provenientes de plantas inoculadas con cultivos de M1024 o NET30 en medio Harada. En el citoplasma de células infectadas por NET30 (figura III-22A) se observó una gran cantidad de ribosomas y simbiosomas (S). El citoplasma de los bacteroides contenía

inclusiones translúcidas de poli- β -hidroxibutírico y gránulos electrodensos de glucógeno, acorde con una ultraestructura normal.

Sorprendentemente, la MET de nódulos desarrollados en plantas inoculadas con M1024 (figura III-22B), reveló ausencia o escaso número de simbiosomas con bacteroides en el citoplasma de las células (nódulos vacíos) y la presencia de vacuolas (V) de gran tamaño, ambas características de un proceso simbiótico alterado.

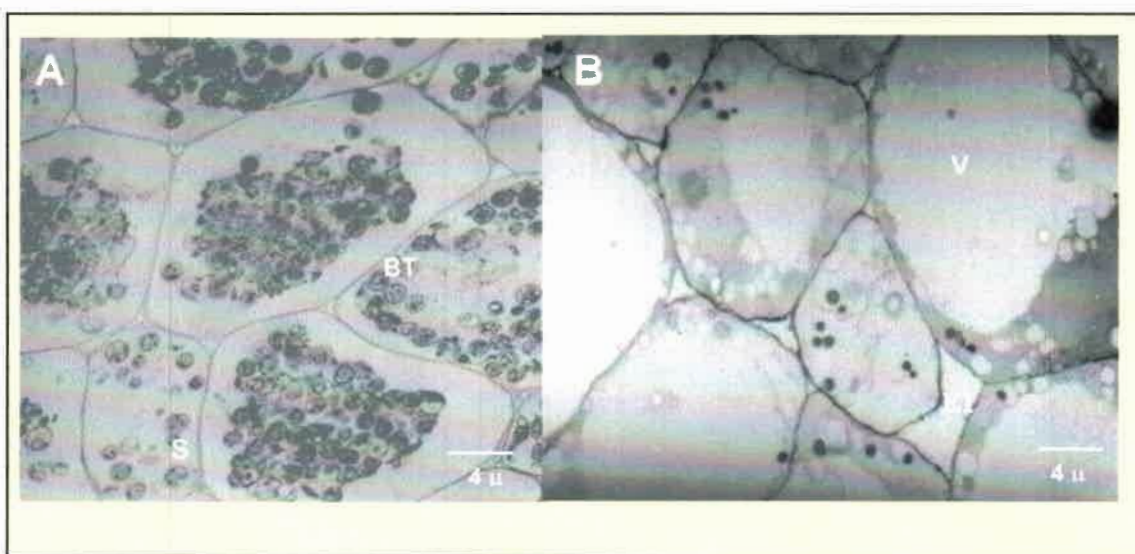


Figura III-22. MET de nódulos provenientes de plantas de maní inoculadas con cultivos de NET30 (izquierda) y M1024 (derecha) crecidos en medio Harada (Glucosa 2.5 g l⁻¹). Abreviaturas: (S) Simbiosoma; (BT) Bacterioide; (V) Vacuola;

Numerosos trabajos han informado acerca de diferentes alteraciones en la organogénesis de nódulos determinados e indeterminados desarrollados por mutantes completamente deficientes en la producción de EPSs: retraso en la nodulación y formación de nódulos con numerosas vesículas vacías y escasos BTs en plantas de soja (*Glycine max*) inoculadas con diferentes mutantes de *B. japonicum* 2143 (Eggleston y col., 1996); hilos de infección abortados y nódulos vacíos en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) o vicia (*Vicia sativa* subsp. *nigra*) inoculadas con mutantes EPS⁻ de *S. meliloti* o de *R. leguminosarum*, respectivamente (Leigh y Coplin, 1992; Urzainiqui y Walker, 1992; Laus y col., 2004).

La interacción ineficiente con las plantas huéspedes de mutantes rizobianas EPS⁻ ha sido atribuida a que estos polisacáridos actuarían a) como componentes críticos de la matriz de los hilos de infección (Stacey y col., 1991), b) como molécula señal durante el desarrollo de los nódulos (Gage, 2004), c) como moduladores de las respuestas de defensa de las plantas (Wielbo y col., 2004), d) previniendo la aglutinación de las bacterias en el interior de los hilos de infección (Laus y col., 2004). A partir de la caracterización del fenotipo simbiótico de la mutante M1024, se desprende que:

1- cuando M1024 produce un 83% del total de los EPSs sintetizados por la cepa silvestre, desarrolla un menor número de nódulos en plantas de maní, morfológicamente similares a los formados por NET30, con células infectadas. Sin embargo, estas plantas presentan una leve aunque significativa disminución en el PSA y contenido de N (Tabla III-6).

2- cuando M1024 produce sólo un 47% del total de los EPSs sintetizados por NET30, su inoculación en maní resulta en una reducción mucho más marcada en el número de nódulos totales, los que además presentan células no invadidas (Tabla III-7).

En conjunto, estos resultados destacan la importancia de la producción de cantidades normales de polisacáridos rizobianos extracelulares para una eficiente infección y nodulación en maní.

4.5. Rol de los EPSs rizobianos en la protección frente a mecanismos de defensa de las plantas.

Durante las primeras etapas de la simbiosis, los rizobios son inicialmente reconocidos como "intrusos" por las plantas huéspedes. Ellos, deben por lo tanto, ser capaces de suprimir las reacciones de defensa que las leguminosas desencadenan para completar eficientemente el proceso de nodulación.

Las defensas de las plantas incluyen una serie de barreras físicas y actividades biológicas desencadenadas para prevenir daños en sus tejidos causados por la entrada de diferentes organismos. En condiciones normales,

estas reacciones de defensa están limitadas al sitio de infección de los simbioses. Algunos ejemplos incluyen la inducción de fitoalexinas, deposición de compuestos fenólicos, liberación de glucanasas y quitinasas, formación de papilas con deposición de calosa, muerte celular programada, etc. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) actuarían en las distintas etapas de la simbiosis, posiblemente como señales intermediarias que inducen la expresión de genes de las plantas relacionados con la defensa local (Mittler y col., 1996; Álvarez y col., 1998). Si bien son moderadamente reactivos, éstos pueden ser convertidos a especies más reactivas como el radical hidroxilo (OH^\cdot) y, posiblemente, peroxinitrito (Bolwell, 1999).

Numerosas evidencias demuestran que los polisacáridos de superficie rizobiana, fundamentalmente EPSs, juegan un rol central en la evasión de las respuestas de defensa (Niehaus y col., 1993; Perotto y col., 1994; Laus y col., 2004; Wielbo y col., 2004). D'Haese y col. (2004), postularon que los EPSs de *Azorhizobium caulinodans* actuarían como barrera de protección frente al influjo de H_2O_2 liberado por su leguminosa huésped *Sesbania rostrata*.

Boogerd y van Rossum (1997) propusieron que maní secreta una variedad de compuestos que mediarían las respuestas de defensa de las plantas frente a la invasión por microorganismos. En este sentido, Azpilicueta y col. (2003) observaron que la síntesis de fitoalexinas en maní se encuentra incrementada luego de la inoculación con *Bradyrhizobium spp.*

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió evaluar si la alteración observada en el proceso de simbiosis inducido por la mutante M1024 podría atribuirse a un posible rol de los EPSs de simbioses de maní en la protección frente a mecanismos de defensa de las plantas. En este caso, la mutante alterada en la producción de EPSs sería más sensible a la acción de las moléculas de defensa liberadas por la leguminosa, afectándose de este modo el proceso de simbiosis. Los rizobios son bacterias gramnegativas que producen la enzima catalasa capaz de degradar el H_2O_2 generando H_2O y gas O_2 . Por lo tanto, la menor liberación de O_2 a partir de H_2O_2 en bacterias productoras de EPSs, en relación a sus respectivas mutantes, constituiría una

evidencia de la capacidad de estos compuestos de bloquear la entrada de H_2O_2 en dichas células.

En este estudio se encontró que la mutante M1024 libera una cantidad significativamente ($p < 0.05$) mayor de gas oxígeno (1.08 ± 0.01 burbujas de $O_2 \text{ min}^{-1}$) respecto de la cepa silvestre (0.58 ± 0.04 burbujas de $O_2 \text{ min}^{-1}$) lo cual podría deberse a un incrementado influjo de H_2O_2 . Estos resultados no pueden atribuirse a variaciones en el número de células viables presentes en las colonias de M1024 y de NET30 debido a que no se encontraron diferencias significativas en dicho parámetro (M1024: $11.3 \times 10^7 \pm 4.3 \times 10^7$ ufc colonia⁻¹; NET30: $4.94 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^7$ ufc colonia⁻¹). Es interesante el hecho de que la síntesis reducida de EPSs en la mutante M1024 incremente su permeabilidad al influjo de H_2O_2 . La producción de cantidades normales de EPSs en microsimbiontes de maní podría ser, por lo tanto, esencial para el establecimiento de una cubierta viscosa alrededor de las bacterias que actúe como barrera de protección, impidiendo la difusión al citosol de especies reactivas del oxígeno, tal como ha sido informado para otras simbiosis rizobio-leguminosa. La inducción por la mutante M1024 de nódulos vacíos, desprovistos de bacteroides, podría atribuirse, al mayor influjo de H_2O_2 . Este compuesto posee actividad antimicrobiana y su producción en las plantas se relaciona con la respuesta primaria en las interacciones incompatibles. Debido a que en maní los rizobios invaden el córtex radical intercelularmente y por lo tanto, se encuentran constantemente expuestos al sistema de defensa de las plantas, resulta altamente probable que los polisacáridos rizobianos participen activamente en la protección de los microsimbiontes durante el proceso de invasión de estos nódulos.

**CONSIDERACIONES FINALES
Y CONCLUSIONES.**

CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES.

Los rizobios son bacterias del suelo que poseen la capacidad de asociarse simbióticamente con plantas leguminosas y desarrollar nódulos fijadores de nitrógeno en tallos y raíces. Dicha interacción le permite a la planta crecer adecuadamente en suelos empobrecidos en este nutriente disponiendo de nitrógeno asimilable para sus diferentes requerimientos metabólicos.

Entre las leguminosas, el cultivo de maní en Argentina tiene gran incidencia en el desarrollo socio-económico de la provincia de Córdoba, donde se concentra su producción, y constituye un importante ingreso de divisas por sus características diferenciales. La práctica de inoculación en leguminosas con cepas rizobianas seleccionadas puede constituir una herramienta biotecnológica interesante para incrementar el rendimiento del cultivo, contribuyendo a la conservación de la fertilidad nitrogenada del suelo, necesaria para una agricultura sustentable. Sin embargo, dicha práctica posee cada vez menos adeptos entre los agricultores debido a la dificultad de reemplazar las cepas indígenas, que en muchos casos son ineficientes, por las inoculadas. Los genotipos rizobianos se encuentran diferencialmente adaptados a las condiciones del suelo y sería dicha adaptación la que principalmente determina el éxito en la competencia por la ocupancia de los nódulos.

En un intento por resolver este problema, se seleccionó a la cepa de crecimiento rápido NCHA22 obtenida a partir de suelos maniseros de Córdoba, para evaluar su posible utilización como inoculante de maní. Esta cepa es altamente eficiente en la FBN en maní y tolerante a condiciones adversas como acidez y salinidad. Otra ventaja adicional de NCHA22 es que su mayor velocidad de crecimiento, en comparación con la recomendada como inoculante *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144, reduce los tiempos y costos de la preparación del inoculante.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron una mayor competitividad para ocupar nódulos en maní del microsimbionte NCHA22 frente

a la cepa *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144. Por otra parte, su alta efectividad para nodular maní en presencia de poblaciones indígenas y en estadíos tempranos del cultivo, podría redundar en un mayor rendimiento y/o en una mejor calidad de las semillas al finalizar el ciclo de este cultivo.

Si bien las bases genéticas de la competitividad para la formación de nódulos no ha sido profundamente estudiada, se ha postulado que se encuentra controlada por numerosos factores tales como el genotipo de la leguminosa huésped, los genes de nodulación rizobianos, la quimiotaxis y la movilidad, la producción de compuestos antimicrobianos y la fisiología de la superficie celular, entre otros. La localización externa de los polisacáridos de superficie bacteriana y sus propiedades químicas, contribuyen tanto a la protección celular contra influencias ambientales como a la adherencia a diferentes superficies y comunicación célula-célula. Diferentes investigadores postularon que los EPSs serían esenciales para la ocupación de los nódulos desarrollados en plantas que son invadidas mediante hilos de infección.

De este modo, el estudio del rol de los EPSs en la invasión de leguminosas que, como maní, no forman hilos de infección, tiene importancia no sólo por su contribución al conocimiento de los mecanismos moleculares de dicha interacción, sino también por la posibilidad de aportar información que podría ser requerida para manipular la competitividad rizobiana.

En esta tesis se obtuvo una mutante alterada en la producción de EPSs a partir de una cepa nativa nodulante de maní y altamente eficiente en la FBN.

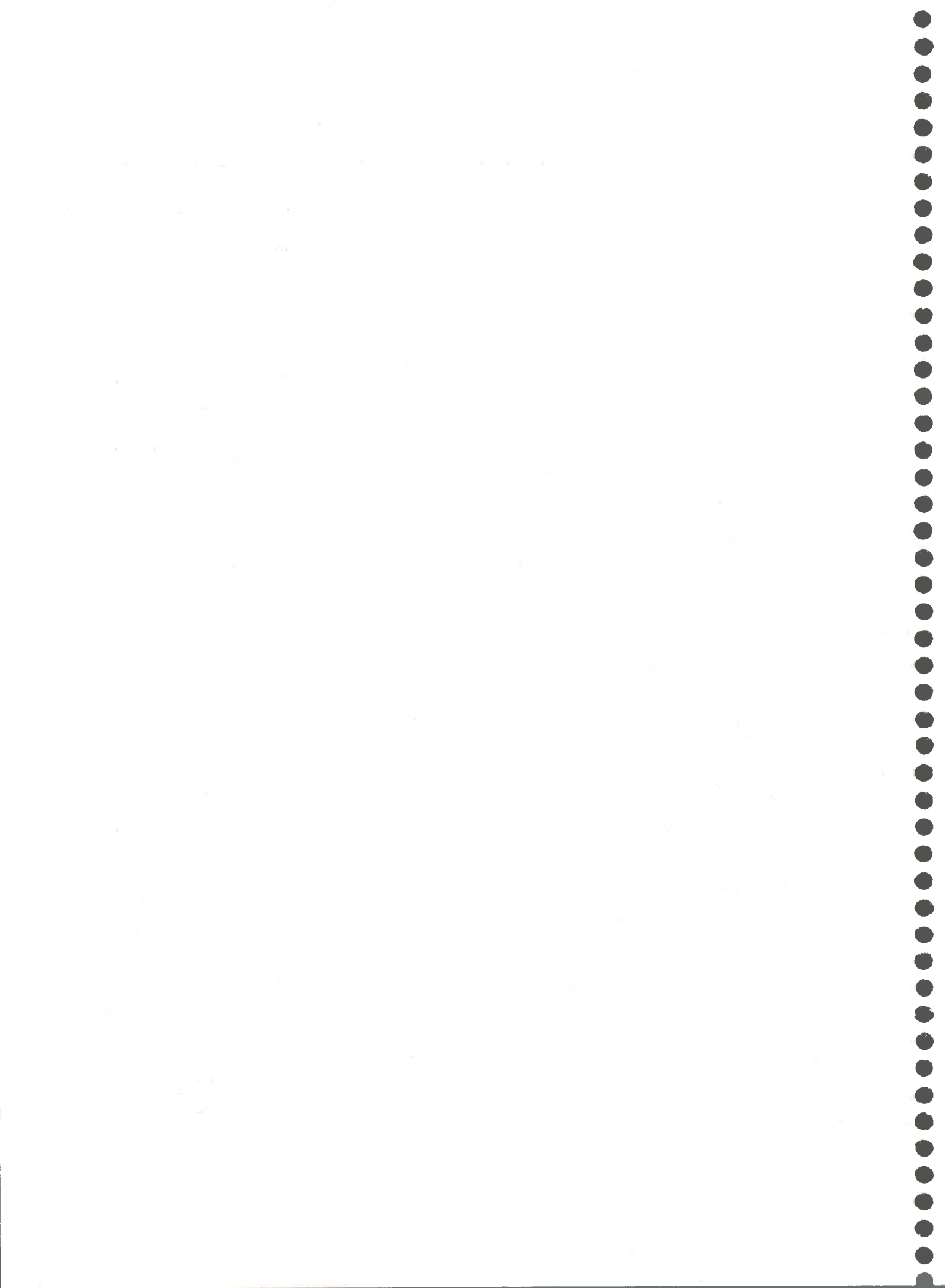
Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten concluir que, al igual que lo informado para el proceso de invasión de leguminosas por hilos de infección, los EPSs rizobianos juegan un rol importante en la infección mediada por el mecanismo de "crack entry", aspecto que no había sido estudiado hasta ahora. Se postula que los EPSs serían requeridos para la protección de los rizobios nodulantes de maní frente a los mecanismos de defensa que se desencadenen durante la invasión del tejido vegetal. Conjuntamente, la información generada refuerza las evidencias obtenidas para otras leguminosas, sobre la importancia de estos polisacáridos en la formación de nódulos determinados.

En síntesis, con este trabajo de tesis se ha contribuido al conocimiento de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa, especialmente en los aspectos referidos al rol de los EPSs en la infección por "crack entry". Se discuten además, las posibles ventajas de la implementación de prácticas de inoculación en maní empleando cepas nativas seleccionadas por su mayor velocidad de crecimiento, tolerancia a condiciones adversas y eficiencia en la FBN con el objeto de asegurar una mayor competitividad frente a poblaciones rizobianas presentes en suelos de la provincia de Córdoba.





**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**



- Abe, M., Amemura, A., and Higashi, S.** 1982. Studies on cyclic (1-2) glucan obtained from periplasmic space of *Rhizobium trifolii* cells. *Plant & Soil* **64**: 315-324.
- Ackermann, B.** 2005. El Mercado internacional: un escenario incierto. XX Jornada Nacional de Maní. Gral. Cabrera (Córdoba). Pág 54-56.
- Alazard, D., and Duhoux, E.** 1990. Development of stem nodules in a tropical forege legume *Aeschynomene afraspera*. *J. Experim. Bot.* **41**: 1199-1206.
- Allen, O., N., and Allen, E., K.** 1981. The Leguminosae: A source book of characteristics. Uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. Madison. USA (800 pages).
- Alvarez, M. E., Pennell, R. L., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A., and Lumb, C.** 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784.
- Amarger, N.** 1981. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. *Soil. Biol. Biochem.* **13**: 481-486.
- Amemura, A., Moori, K. and Harada, T.** 1974. Purification and properties of a specific, inducible β -glucanase, succinoglycan depolymerase, from *Flavobacterium*. *Biochim. Biophys. Acta.* **334**: 398-409.
- Angelini, J., Taurian, T., Morgante, C., Ibáñez, F., Castro, S., and Fabra, A.** 2005. Peanut nodulation kinetics in response to low pH. *Plant Physiol. Biochem* **43**: 754-759.
- Arséne F., Katupitiya S., Kennedy I., and Elmrigh C.** 1994. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasiliense* in association with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 748-757.
- Ausmees, N., Jonsson, H., Höglund, S., Ljunggren, H., and Lindberg, M.** 1999. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. *Microbiol.* **145**: 1253-1262.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Smit, J., Seidman, J., and Struhl, K.** 1990. Current protocols in molecular biology, John Wiley, Inc. New York.

- Azpilicueta, C. E., Zawoznik, M. S., and Tomaro, M. L.** 2004. Phytoalexins synthesis is enhanced in groundnut plants inoculated with *Bradyrhizobium sp.* (*Arachis*). *Crop Protection* **23**: 1069-1074.
- Baldwin, I. L., and Fred, E. B.** 1929. Strain variation in the root nodule bacteria of clover, *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* **17**: 17-18.
- Batley, M., Redmond, J. W., Djordveric S., and Rolfe, B.** 1987. Minor structures in β -D-glucans from a fast growing *Rhizobium* species. *Biochim. Biophys. Acta.* **901**: 119-126.
- Battisti, L., Lara, J. C and Leigh, J. A.** 1992. Specific oligosaccharide from of the *R. meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5625-5629.
- Beattie, G. A., Cuayton, M. K., and Handelsmann, J.** 1989. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Env. Microbiol.* **55**: 2755-2761.
- Becker, A., Kleikmann, A., Arnold, W., Keller, M., and Pühler, A.** 1993b. Identification and analysis of *Rhizobium meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. *Mol. Gen. Genet.* **241**:367-379.
- Becker, A., and Pühler, A.** 1998. Production of exopolysaccharides. Pages: 97-118 in: *Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykas, P. J., eds. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.
- Becquart-de Kozak, I., Reuhs, B.L., Buffard, D., Breda, C., Kim, J.S., Esnault, R., & Kondorosi, A.** 1997 Role of the K-antigen subgroup of capsular polysaccharides in the early recognition process between *Rhizobium meliloti* and alfalfa leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**: 114-123.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., and Squartini, A.** 2004. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 462 – 468.
- Beringer J.** 1974. R. factor transfer in *R. leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-189.

- Bhagwat, A. A., and Keister, D. L.** 1992. Synthesis of β -glucans by *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium fredii*. *Can. J. Microbiol.* **38**: 510-514.
- Bhagwat, A. A., Gross, K. C., Tully, R. E., and Keister, D. L.** 1996. β -glucan synthesis in *B. japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing (1-6) linkages. *J. Bacteriol.* **178**: 4635-4642.
- Bhagwat, A., Mithöfer, A., Pfeffer, P., Kraus, C., Spickers, N., Hotchkiss, A., Ebel, J., and Keister, D.** 1999. Further studies of the role of cyclic β -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *B. japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1-3)- β -glucosyl. *Plant Physiol.* **119**: 1057-1064.
- Bhat, U. R., Krishnaiah, B. S., and Carlson, R. W.** 1991. Re-examination of the structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*. *Carbohydr. Res.* **220**: 219-227.
- Bhat, U. R., Forsberg, L. S., and Carlson, R. W.** 1994. Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **269**: 14402-14410.
- Bolwell, G.** 1999. Role of active species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 287-294.
- Boogerd, F. C., and van Rossum, D.** 1997. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 5-27.
- Borthakur, D., Barber, R. F., Latchford, J. W., Rossen, L., and Johnston, A. W.** 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans of *R. phaseoli* and is corrected by cloned DNA from *Rhizobium* or the phytopathogen *Xantomonas*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 320-323.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Breedveld, M., Zevenhuizen, L., and Zehnder, A.** 1990. Osmotically-induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. J. Gen. Microbiol. **136**: 2511-2519.
- Breedveld, M. W., Dijkema, C., Zevenhuizen, L. P., and Zhender, A. J. B.** 1993. Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium meliloti* Su47. J. Gen. Microbiol. **139**: 3157-3163.
- Breedveld, M., W., and Miller, K., J.** 1994. Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. Microbiol. Rev. **58**: 145-161.
- Breedveld, M., Hadley, J., and Miller, K.** 1995. A novel cyclic β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **177**: 6346-6351.
- Brozek, K. A., Kadrmas, J. L., and Raetz, C. R. H.** 1996. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. **271**: 32112-32118
- Buendía, A. M., Enenkel, B., Köplin, R., Niehaus, K., Arnold, W., and Pühler, A.** 1991. The *Rhizobium meliloti* *exoZ/exoB* fragment of megaplasmid 2: ExoB functions as UDP-glucose-4-epimerase and ExoZ shows homology to NodX of *R. leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM. Mol. Microbiol. **5**: 1419-1530.
- Busso, G., Civitaresi, M., Geymonat, A., y Roig, R.** 2004. Situación socioeconómica de la producción de maní y derivados en la región centro-sur de Córdoba. Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Río Cuarto, Córdoba. Pág 163.
- Cámara Argentina del Maní,** 1989. Relevamiento muestral del área de siembra del maní en la provincia de Córdoba. Campaña agrícola 1988/89. Panorama Manisero **7**: 26-29.
- Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J. A., Lee, C. C., Tines C., and Nester E. W.** 1989. Role of *A. tumefaciens* ChvA protein in export of β (1-2) glucan. J. Bacteriol. **171**: 1609-1615.

- Cangelosi, G. A., Martinetti, G., and Nester, W. E.** 1990. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β (1-2) glucan. *J. Bacteriol.* **171**: 2172-2174.
- Carlson, A. J., Glushka, R. W., and Streeter, J. G.** 1995. The structure of a novel polysaccharide produced by *Bradyrhizobium* species within soybean nodules. *Carbohydr. Res.* **269**: 307-317.
- Castro, O. A., Zorreguita, A., Ielmini, V., Vega, C., and Ielpi, L.** 1996. Cyclic β -(1,2)-glucan synthesis in *Rhizobiaceae*: roles of the 319-kilodalton protein intermediate. *J. Bacteriol.* **178**: 6043-6048.
- Castro, S., Carrera, I., and Martinez-Drets, G.,** 2000. Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains production as a marker. *J. Microbiol. Methods* **41**: 173-177.
- Cebolla, A., and Palomares, A. J.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Microbiología* **10**: 371-384.
- Cermola, M., Federova, E., Taté, R., Riccio, A., Favre, R., and Patriarca, E.** 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *MPMI.* **7**: 733-741.
- Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J. W., and Beauchamp, C. J.** 1996. Root Colonization of Maize and Lettuce by Bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 2767-2772.
- Chandler, M. R., Date, R. A., and Roughley, R. J.** 1982. Infection and root-nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. *J. Experim. Botany* **33**: 47-57.
- Chen, H., Richardson, A. E., Gartner, E., Djordjevic, M. A., Roughley, R. J., and Rolfe, B.** 1991. Construction of an acid-tolerant *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain with enhanced capacity for nitrogen fixation. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 2005-2007.
- Chen, W., Lionel, M., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G., and Boivin-Masson, C.** 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by α -Proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* **185**: 7266 – 7272.

- Chen, R., Bhagwat, A. A., and Keister, D. L.** 2003b. A motility revertant of the *ndvB* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Curr. Microbiol.* **47**: 431-433.
- Cheng, H. P. and Walker, G. C.** 1998. Succinoglycan is required for initiation of infection thread formation.
- Cholaky, L., Giayetto, O., Neuman, E. y Cavaignac, S.** 1983. Respuesta del maní (*Arachis hypogaea* L.) a la inoculación al suelo con *Rhizobium spp.* *Rev. UNRC* **3**: 173-179.
- Choma, A., Urbanik-Spiniewska, T., Russa, R., Kultkowska, J., and Mayer, H.** 2000. Occurrence and taxonomic significance of oxo-fatty acids in lipopolysaccharides from members of *Mesorhizobium*. *System. Appl. Microbiol.* **23**: 185-190.
- Cisneros, J. M.** 2001. Uso de las tierras en el sur de Córdoba. *Revista Agro Mercado: Maní*. pág. 23-24. ISSN nº 1514-223X.
- Coventry, D. R., and Hirth, J. R.** 1992. Effects of tillage and lime of *Rhizobium trifolii* populations and survival in wheat-subterranean clover rotation in southeastern Australian. *Soil and Tillage Res.* **25**: 67-74.
- Cregan, P. B., Keyser, H. H., and Sadowsky, M. J.** 1989. Soybean genotype restricting nodulation of a previously unrestricted serocluster 123 bradyrhizobia. *Crop Sci.* **29**: 307-312.
- Dardanelli, M., Angelini, J., and Fabra, A.** 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Can. J. Bacteriol.* **49**: 399-405.
- Dazzo, F. B., and Truchet, G. L.** 1983. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Membr. Biol.* **73**: 1-16.
- Dazzo, F. B., Truchet, G. L., Hollingsworth, R. I., Hrabak, E. M., Pankratz, H. S., Philip-Hollingsworth, S., Salzwedel, J. L., Chapman, K., Appenzeller, L., Squartini, A., Gerhold, D., and Orgambide, G.** 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.* **173**: 5371.

- D'Haeze, W., Glushka, J., De Rike, R., Holsters, M., and Russell, W. C.** 2004. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol. Microbiol.* **52**(2): 485-500.
- de Maagd, R. A., Rao, A. S., Mulders, I. H. M., Goosen-de Roo, L., van Loosdrecht, M. C. M., Wijffelman, C. A., and Lugtenberg, B. J.** 1989. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides. Possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from infection thread. *J. Bacteriol.* **171**: 1143-1150.
- Dickstein, R. T., Bisseling, T., Reinhold, V. N. and Ausubel, E. W.** 1988. expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. *Genes Dev.* **2**: 677-687.
- Dische, Z.** 1962. General color reactions. In *Methods Carbohydr. Chem* **1**: 478-492
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D. R.** 1980. Broad host range cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank for *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 7347-7351.
- Djordjevic, S. P., Batley, M., Redmond, J. W., and Rolfe, B. G.** 1986. The structure of the exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. strain ANU280 (NGR234). *Carbohydr. Res.* **148**: 87-99.
- Djordveric, S. P., Chen, H., Batley, M., Redmond, J. W., and Rolfe, B.** 1987. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **169**: 53-60.
- Douglas, C. J., Staneloni, R. J., Rubin, R. A., and Nester, E. W.** 1985. Identification and genetic analysis of an *A. tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* **161**: 850-860.

- Dudman, W., Franzén, L., Darvill, J., McNeil, M., Darvill, A., and Albersheim, P.** 1983. The structure of acidic polysaccharide secreted by *R. phaseoli* strain 127K36. *Carbohydr. Res.* **147**: 141-156.
- Dunham, D. H., and Baldwin, I. L.** 1931. Double infection of leguminous plantas witho good and poor strains of rhizobia. *Soil. Sci.* **32**: 235-249.
- Dusha, L., Boglárka, O., Szegletes, Z., Erdei, L., and Kondorosi, A.** 1999. *syrM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide in *R. meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 755-765.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanovski, M., Nester, E., Helinski, D., and Ditta G.** 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule deveopment are related to chromososomal virulence genes in *Agrobacterium tomeffaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **83**: 4403-4407.
- Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D., and Ditta, G.** 1990a. Symbiotic pseudorevertanats of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **172**: 1409-1417.
- Dylan, T., Helinski, D., and Ditta G.** 1990b. Hypoosmotic adaptation in *R. meliloti* requires $\beta(1-2)$ glucan. *J. Bacteriol.* **172**: 1400-1408.
- Eggleston, G., Huber, M. C., Liang, R., Karr, A. L., and Emerich, D. W.** 1996. *B. japonicum* Mutants Deficient in Exo and Capsular Polysaccharides cause Delayed Infection and Nodule Initiation. *The American Phytopathological Society. Vol. 9.* **5**:419-423.
- Evans, P., Howieson, J. G., and Nutt, B.** 2004. Increased yield and persistence of several annual medic species and *Medicago sativa* by inoculation with selected strains of *Sinorhizobium meliloti*. *Aust. J. Experim. Agricult.* 2004 (in press).
- Finan T. M., Hirsch A. M., Leigh J. A., Johansen E., Kuldau G. A., Deegan S., Walker G. C. and Signer E. R.** 1985. Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell* **40**: 869-877.

- Fischer, R. F., and Long, S. R.** 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**: 655-650.
- Fosberg, L. S., and Reuhs, B.** 1997. Structural characterization of K antigens from *R. fredii* USDA257: evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* **179**: 5366-5371.
- Fosberg, L. S., and Carlson, R. W.** 1998. The structures of the lipopolysaccharides from *R. etli* strains CE358 and CE359 – the complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **273**: 2747-2757.
- Fosberg, L. S., Bhat, R. R., and Carlson, R. W.** 2000. Structural characterization of the lipopolysaccharide of *R. etli* CE3. *J. Biol. Chem.* **275**: 18851-18863.
- Franssen, H. J., Vijin, I., Yang, C., and Bisseling, T.** 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbioses. *Plant, Mol. Biol.* **19**: 89-107.
- Frayse, N., Couderc, F., and Poinso, V.,** 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 1365 – 1380.
- Fry, J., Wood, M., and Poole, P. S.** 2001. Investigation of myo-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* and its effect on nodulation competitiveness. *MPMI* **14**: 1016-1025.
- Gage, D. J., Bobo, T., and Long, S. R.** 1996. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.* **178**: 7159-7166.
- Gage, D. J.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 280-300.
- Gao, M., D'Haese, W., De Rycke, R., Wolucka, B., and Holsters, M.** 2001. Knockout of an azorhizobial dTDP-Rhamnose synthase affects lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide production and disables symbiosis with *Sesbania rostrata*. *MPMI* **14**: 857-866.

- Garret, R. H., and Grisham, C. M.** 1995. Gluconeogenesis, glycogen metabolism, and the pentose pathway. In Biochem., p689. Saunders College Publishing, Philadelphia, Pa.
- Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J., and Ugalde, R. A.** 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form β -(1,2)-glucan. *J. Bacteriol.* **169**: 880-884.
- Giandana, E.** 1997. Cultivares. En Manual del Maní, 2^o edición. Pag: 7-9. (R. Peledini y C. Casini, eds). EEA INTA Manfredi, Córdoba.
- Giandana, E.** 1971. Inoculación y peletado en semillas de maní. IADO-INTA, BIM **22**: 14.
- Gil-Serrano, A. M., González-Jiménez, I., Mateo, P. T., Bernabé, M., Jiménez-Barbero, J., Megías, M., and Romero-Vázquez, M. J.** 1995. Structural analysis of the O-antigen of lipopolysaccharide of *R. tropici* CIAT899. *Carbohydr. Res.* **275**: 285-294.
- Gibson, A. H., Date, R. A., Ireland, J. A., and Brockwell, J.** 1976. A comparison of effectiveness and persistence amongst five strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil. Biol. Biochem.* **8**: 395-401.
- Glazebrook, J., and Walker, G.C.** 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of Calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *R. meliloti*. *Cell* **56**: 661-672.
- Gluksmann, M, A., Reuber, T, L., and Walker, G, C.** 1993a. Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **175**: 7033-7044.
- Gluksmann, M, A., Reuber, T, L., and Walker, G, C.** 1993b. Genes needed for the modification, polymerization, export and processing of Succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**: 7045-7055.

- Gonzáles, J. E., Reuhs, B. L., and Walker, G. C.** 1996. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**: 8636-8641.
- Gonzáles, J. E., Semino, C. E., Wang, L., Castellano-Torres, L. E., and Walker, G. C.** 1998. Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 13477-13482.
- Gottfert, M.** 1993. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. FEMS Microbiol. Rev. **104**: 39-64.
- Graham, P.** (1963). Antibiotic sensitivities of the root-nodule bacteria. Aust. J. Biol. Scien. **16**: 557-559.
- Gray, J. X., and Rolfe, B. G.** 1990. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. Mol. Microbiol. **4**: 1425-1431.
- Gray, J. X., de Maagd, R. A., Rolfe, B., Johnston, A. W., and Lutenberg, B. J.** 1992. The role of the *Rhizobium* cell surface during symbiosis. In Mol. Signals in Plant-Microbe Communications, ed. Verma, D. P. S. pp: 359-376. Florida. CRC. Press ISBN 0-8493-5905-8.
- Groisman, A. G., and Ochamn, H.** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell **87**: 791-794.
- Halbleib, C. M., and Ludden, P. W.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. J. Nutr. **130**: 1081-1084.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**: 557-580.
- Handelsman, J., Brill, W. J.** 1985. *Erwinia herbicola* isolates from alfalfa plants may play a role in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 818-21
- Harimann, A., Girand, J. J., and Catroux, G.** 1998. Genotype diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) *meliloti* strains isolated directly from a soil

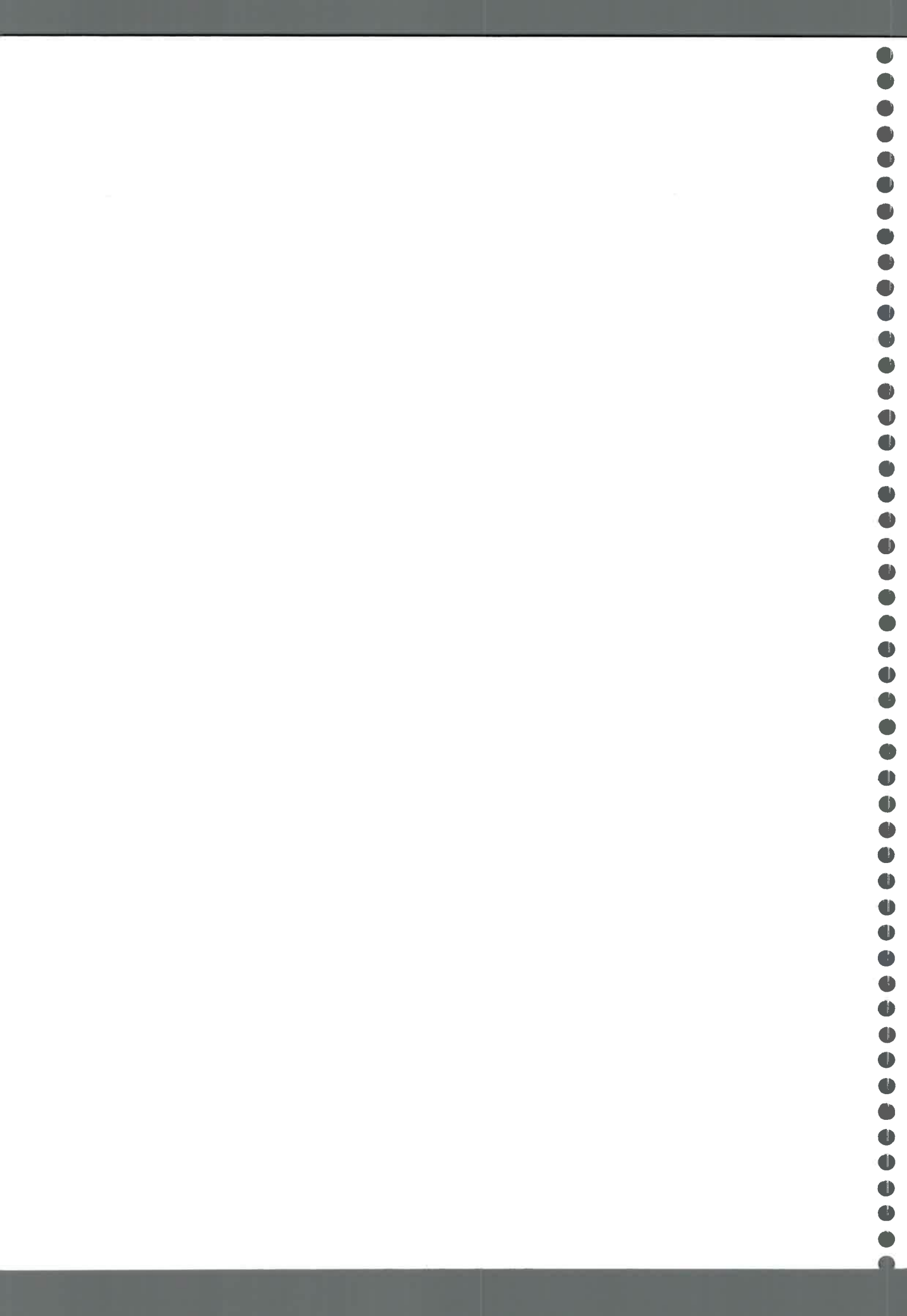
- and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. FEMS Microbiol. Ecol. **25**: 107-116.
- Harte, M., Baliña, R. M., and Díaz-Zorita, M.** 2005. Calidad de granos de maní según tratamientos de inoculación. XX Jornada Nacional de Maní. 22 de Setiembre de 2005, Gral. Cabrera (Córdoba) pág 26-28.
- Haukka, K., Lindström, K. and Young, P. J.** 1998. The phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. Appl. Env. Microbiol. **64**: 419-426.
- Hernández, L. E., Perotto, S., Brewin, N. J., and Drobak., B. K.** 1995. A novel inositol-lipid in plant bacteria symbiosis. Biochem. Soc. Trans. **23**: 582S.
- Hirsch, A. M., Lum, M. R., and Downie, J. A.** 2001. What make the Rhizobial-Legume symbiosis so special? Plant Physiol. **127**: 1484-1492.
- Hoagland, D. R., and Arnon, D. I.** 1950. Water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347.
- Hollingsworth, S. P., Hollingsworth, R. I., and Dazzo, F. B.** 1989. Host-range related structural features of the acidic extracelular polysaccharide of *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. **264**: 1561-1466.
- Ielpi, L., Dylan, T., Ditta, G., Helinski, D., and Stanfield, S.** 1990. The *ndvB* locus of *R. meliloti* encodes a 319 kDa protein involved in the production of $\beta(1-2)$ glucan. J. Bacteriol. Chem. **265**: 2843-2851.
- Ielpi, L., Couso, O., and Dankert, M. A.** 1993. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. J. Bacteriol. **175**: 2490-2500.
- Instituto Nacional de Tecnología Agrícola (INTA Manfredi).** 1997. En; Manual del Maní, 2º Edición.

- Janecka, J., Jenkins, M. B., Brackett, N. S., Lion, L. W., and Ghiorse, W. C.** 2002. Characterization of a *Sinorhizobium* isolate and its extracellular polymer implicated in pollutant transport in soil. *Appl. Env. Microbiol.* **68**: 423-426.
- Janczarek, M., and Skorupska, A.** 2003. Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is related to various metabolic pathways. *Res. Microbiol.* **154**: 433-442.
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. Mc. Gaw-Hill, New York and London.
- Kannenberg, E. L., Reuhs, B. L., Forsberg, L. S., and Carlson, R. W.** 1998. Lipopolysaccharides and K antigens: their structure, biosynthesis and functions. In *The Rhizobiaceae*: (H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykas, eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp: 119-154.
- Kannenberg, E. L., and Carlson, R. W.** 2001 Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol. Microbiol.* **39**: 379-391.
- Kape, R., Parniske, M., and Werner, D.** 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamics and isoflavonoids. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**: 316-319.
- Karr, D. B., Liang, R-T., Reuhs, B. L., and Emerich, D. W.** 2000. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta* **211**: 218-226.
- Kato, G., Maruyama, Y., and Nakamura, M.** 1980. Role of bacterial polysaccharides in the adsorption process of the *Rhizobium*-pea symbiosis. *Agricult. Biol. Chem.* **44**: 2843-2855.
- Kaufusi, P. H., Fosberg, S., Tittabutr, P., and Borthakur, D.** 2004. Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, *rpoH2*. *Microbiol.* **150**: 3473-3482.

- Keller, M., Roxlau, A., Weng, W. M., Schmidt, M., Quand, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W., and Pühler, A.** 1995. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 267-277.
- Kereszt, A., Kiss, E., Reuhs, B. L., Carlson, R. W., Kondorosi, A., and Putnoky, P.** 1998. Novel *rkp* gene clusters of *S. meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the *rkpK* gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **180**: 5426-5431.
- Kijne, J. W.** 1992. The *Rhizobium* infection process. Pp: 349-398. In G. Stacey, R. Burris & H. D. Evans (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and hall, New York, USA.
- Kim, C. H., Tully, R. E., and Keister, D. L.** 1989. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium fredii* HH303 which are symbiotically effective. *Appl. Env. Microbiol.* **55**: 1852-1859.
- Kinkle, B. K., and Schmidt, E. I.** 1991. Transfer of the pea symbiotic plasmid pJB5J1 in nonsterile soil. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 3264-3269.
- Koes, R., Quattrocchio, F., and Mol, J.** 1994. The flavonoid biosynthesis pathway in plants: function and revolution. *Bio Assay* **16**: 123-132.
- Kosch, K., Jacobi, A., Parniske, M., Werner, D., and Müller, P.** 1994. The Impairment of the Nodulation Process, Induced by a *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide mutant is determined by the genotype of the host plant. *Z. Naturforsch* **49c**: 727-736.
- Koopman, D. J., Tow, P. G., Reeves, T. G., and Gibson, A. H.** 1995. Soil acidification, chlorosulfuron application and *Rhizobium meliloti* as factors in lucerne yield decline. *Soil. Biol. Biochem.* **27**: 673-677.
- Kosslak, R., Bookland, R., Barkli J., Paaren, H., and Appelbaum, E.** 1987. Induction of *B. japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7428-7432.

- Kundu, S., Trent, S. J., and Hargrove, M. S.** 2003. Plants, Humans and Hemoglobins. *Trends. Plant. Sci.* **8**: 387-393.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laeremans, T. and Vanderleyden, J.** 1998. Review: Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World J. Microbiol and Biotech.* **14**: 787-808.
- Lagares, A., Caetano-Anollés, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H. D., Pühler, A., and Favelukes, G.** 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation in alfalfa. *J. Bacteriol.* **174**: 5941-5952.
- Lagares, A., Hozbor, D. F., Niehaus, K., Otero, A. J., Lorenzen, J., and Pühler, A.** 2001. Genetic characterization of *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**: 1248-1258.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan J., Drouin, P., and Amarger, N.** 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Microbiol.* **147**: 981-993.
- Laus, M. C., Logman, T. J., van Brussel, A., Carlson, R. W., Azadi, P, Gao, M., and Kijne, J. W.** 2004. Involvement of *exo5* in production of surface polysaccharides in *Rhizobium leguminosarum* and its role in nodulation of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J. Bacteriol.* **186**: 6617-6625.
- Laus, M. C., Logman, T. J., van Brussel, A., and Kijne, J. W.** 2005. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *MPMI* **18**: 533-538.
- Law, I. J., Yamamoto, Y., Mort, A. J., and Bauer, W. D.** 1982. *Planta* **154**:100-109.
- Leigh J. A., Signe, E. R. and Walker, G. C.** 1985. Exopolysaccharides deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6231—6235.

- Leigh J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M., and Walker, G. C.** 1987. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell*: **51**: 579-587.
- Leigh J. A. and Lee, C. C.** 1988. Characterization of Polysaccharides of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants that form ineffective nodules. *J. Bacteriol.* **170**: 3327-3332.
- Leigh, J. A., and Coplin, D. L.** 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 307-346.
- Leigh, J. A., and Walker, G. C.** 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet* **10**: 63-67.
- Liu, M., González, J., Willis, L., Walker, G.** 1998. A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *App. Env. Microbiol.* **64**: 4600–4602.
- Lloret, L., and Martínez-Romero, E.** 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**: 43-60.
- Lodeiro, A., López García, S., Vázquez, T., and Favelukes, G.** 2000. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its treatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**: 177-184.
- Lorkiewicz, Z.** 1997. Nodulation genes in the *Rhizobium*-plant signal exchange. *Acta Biochimica Polonica* **44**(1):1-12.
- Louch, H., and Miller, K.** 2001. Synthesis of a Low-Molecular-Weight for of Exopolysaccharide by *B. japonicum* USDA 110. *Appl. Env. Microbiol.* **67**: 1011-1014.
- Lupski, J. R., and Weinstock, G. M.** 1992. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 155-173.
- Manoil, C., and Beckwith, D.** 1985. *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8129-8133.
- March, G. J., y Marinelli, A. D.** 2005. En: Enfermedades del maní en Argentina. March y Marinelli (eds). 1º edición. Ed. Biglia Impresores. Córdoba.



- Mazur, A., Król, J., Wielbo, J., Urbanik-Sypniewska, T., and Skorupska, A.** 2002. Mol. Plant Microbe Interact. **15**:388-397.
- Mazur, A., Jaroslaw, E. K., Marczak, M., and Skorupska, A.** 2003. Membrane topology of PssT, the transmembrane protein component of the type I exopolysaccharide transport system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1. J. Bacteriol. **185**: 2503-2511.
- McLoughlin, T. J. and Dunicam, L.K.** 1981. An ecological study of marked strains of *Rhizobium trifolii* on the host plant *Trifolium repens* var. Huia in an acidic peat and a neutral mineral soil. J. Appl. Bacteriol. **50**: 65-72.
- McLoughlin, T. J., Bordeleau, L. M., and Dunicam, L.K.** 1984. Competition studies with *Rhizobium trifolii* in a field experiment. J. Appl. Bacteriol. **56**: 131-135.
- Mendrygal, K. E., and González, J. E.** 2000. Environmental Regulation of Exopolysaccharides Production in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **182**: 599-606.
- Michelena, V., Mata, A. y Pino, F.** 1996. Efectos del P y Ca⁺² en la fijación del nitrógeno atmosférico y el rendimiento del maní en condiciones de invernadero. Memorias de las XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología (Santa Cruz de la Sierra, Bolivia) Pijnenborg, Ruíz y Siles, Eds.
- Miller, K., J, Hadley, J.A, and Gustine, D.L.** 1994. Cyclic β (1-6) β (1-3) glucans of *B. japonicum* USDA 110 elicit isoflavonoid production in the soybean (*Glycine max*) host. Plant Physiol. **104**: 917-923.
- Mittler, R., Schulaev, V., Seskar, M., and Lam, E.** 1996. Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. Plant Cell **8**: 1991-2001.
- Müller, P., Klaucke, A., and Wegel, E.** 1995. TnpA-induced symbiotic mutants of *Bradyrhizobium japonicum* that impair cell and tissue differentiation in *Glycine max* nodules. Planta. **197**: 163-175.
- Mort, A. and Bauer, W. D.** 1980, Composition of the Capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: changes with culture age and

- correlations with binding of soybean seed lectin to the bacteria. *Plant Physiol.* **66**: 158 - 163.
- Mort, A. J., and Bauer, W. D.** 1982. Applications of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* that bind soybean lectin. *J. Biol. Chem.* **257**: 1870-1875.
- Murphy, P. J., Wexler, M., Ggzemski, W., Rao, J. P., and Gordon, D.** 1995. Rhizopines: their role in symbiosis and competition. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 525-529.
- Nagpal, P., Khanuja, S. P. S., and Stanfield, W.** 1992. Suppression of the *ndv* mutant phenotype of *R. meliloti* by clones *exo* genes. *Mol. Microbiol.* **6**: 479-488.
- Nava Juárez R. A., Barrera Necha L. L. y Barrera Ocampo A.** 1997. Efecto de la inoculación de *Bradyrhizobium sp.* en plantas de cacahuete (*Arachis hypogaea*) en Yautepec, Morelos. III Simposio Internacional y IV Reunión Nacional de Agricultura Sostenible. Univ. De Guadalajara, 16-19 de Noviembre.
- Niehaus, K., Kapp, D., and Pühler, A.** 1993. Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPSI)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* **190**: 415-425.
- Niehaus, K., Lagares, A., and Pühler, A.** 1998. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (Alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. *MPMI* **9**: 906.
- Noel, K. D., Forsberg, L. S., and Carlson, R. W.** 2000 Varying the abundance of O- antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* **182**: 5317-5324.
- Obaton, M.** 1971. Use of antibiotic-resistant spontaneous mutant for studying the ecology of *Rhizobium*. *Comptes Rendue Hebdonadaire des Sciences, Paris* **272D**, 2630-2633-

- Oreznik, I. J., Pacarynuk, L. A., O'Brien, S. A., Yost, C. K., and Hynes, M. F.** 1998. Plasmid-encoded catabolic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*: evidence for a plant-inducible rhamnose locus involved in competition for nodulation. *MPMI* **12**: 1175-1185.
- Ozga, D. A., Lara, J. C., and Leigh, J. A.** 1994. The regulation of exopolysaccharide production is important at two levels of nodule development in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**: 758-765.
- Parniske, M., Kosch, K., Werner, D., and Müller, P.** 1993. ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduce competitiveness on *Glycine max*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 99-106.
- Parniske, M., Schmidt, P. E., Kosch, K., and Müller, P.** 1994. Plant defense response of host plants with determinate nodules induced by EPS defective ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 631-638.
- Parveen, N., Webb, D. T., and Borthakur, D.** 1997. The symbiotic phenotypes of exopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium sp.* strain TAL1145 do not differ on determinate and indeterminate nodulating tree legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 364-372.
- Patel, J., and Gerson, T.** 1974. Formation and utilization of carbon reserves by *Rhizobium*. *Arch. Microbiol.* **101**: 211-220.
- Patriarca, E. J., Taté, R., and Iaccarino, M.** 2002. Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in *Rhizobium* – plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 203-222.
- Pellock, B. J., Cheng, H. P., and Walker, G. C.** 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* **189**: 4310-4318.
- Pengue, W.** 2002. Aspectos tecnológicos, ambientales y socioeconómicos de la agricultura pampeana durante la última década: impactos, resultados y consecuencias. Documento presentado en encuentro auspiciado por PROBIOMA y ANAPO, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

- Peoples, O. P., and Sinskey, A. J.** 1989. Poly- β -hidroxybutiyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of PHB polymerase gene (*phbC*). J. Biol. Chem. **264**: 15298-15303.
- Peoples, M. and Craswell, E.** 1992. Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. Plant and Soil **141**:13-39.
- Peoples, M. B., Herridge, D. F., y Lodha, J. K.** 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. Plant and Soil **174**: 4310-4318.
- Perotto, S., Brewin, N. J., and Kannenberg, E. L.** 1994. Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. Mol. Plant-Microbe Interact. **7**: 99-112.
- Phillips, D., Joseph, C., and Maxwell, C.** 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate nodD2 protein in *Rh. meliloti*. Plant Physiol. **99**: 1526-1531.
- Phillips, D, A., and Streit, W, R.** 1996. Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. Plant-microbe Interact. Chapman and Hall, New York, p236-271.
- Phillips, D, A., and Streit, W, R.** 1997. Applying plant-microbe signaling concepts to alfalfa: roles to secondary metabolites. Biotech. and the improvements of forage legumes. CAB International, United Kingdom, p319-342.
- Portaris, J., Tavernier, P., Gosselin, I., and Barbotin, J.** 1999. Cyclic organization of the carbohydrate metabolism in *Sinorhizobium meliloti*. Eur. J. Biochem. **256**: 473-480.
- Puvanesarajah, V., Schell, F., Gerhold, D., and Stacey, G.** 1987. Cell surface polysaccharide from *B. japonicum* and a non-nodulating mutant. J. Bacteriol. **169**: 137-141.
- Quandt, J.,** 1991. Das verhalten von *Rhizobium meliloti* ober flächenkohlenhydratmutaten in der symbiose mit luzerne. PhD thesis, University of Bielefeld , Germany.

- Reed, J. W., Glazebrook, J., and Walker, G. C.** 1991. The *exoR* gene of *Rhizobium meliloti* affects RNA levels of other *exo* genes but lacks homology to known transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **173**: 3789-3794.
- Reddy, G., Mapiki, A., and Singh, B.** 1998. Effect of residual fertilizer N, lime and *Bradyrhizobium* inoculum on groundnut yield, N uptake and N₂ fixation. *Acta Agric. Scand. SectB, Soil and Plant Sci.* **48**: 91-99
- Reuber, T. L., and Walker, G. C.** 1993a. The acetyl substituent of succinoglycano is not necessary for alfalfa nodule invasion of *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* **175**: 3653-3655.
- Reuber, T. L., and Walker, G. C.** 1993b. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharides of *Rhizobium meliloti*. *Cell.* **74**: 269-280.
- Reuhs, B. L., Carlson, R. W., and Kim, J. S.** 1993. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 3570-3580.
- Reuhs, B. L., Kim, J. S., Badgett, A., and Carlson, R. W.** 1994. Production of cell-associated polysaccharides of *Rhizobium fredii* USDA205 is modulated by apigenin and the host root extract. *Plant Microbe Interact.* **7**: 240-247.
- Reuhs, B. L., Williams, M. N. V., Kim, J. S., Carlson, R. W., and Cote, F.** 1995. Suppression of the Fix⁻ phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *IpsZ* is correlated to a modified expression of the K-polysaccharide. *J. Bacteriol.* **177**: 4289-4296.
- Reuhs, B. L., Geller, D. P., Kim, J. S., Fox, J. E., Kolli, V. S., and Peuppke, S. G.** 1998. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4930-4938.
- Rick, P. D., and Silver, R. P.** 1996. *Escherichia* and *Salmonella*. 2nd Ed. F. C. Neidhardt (Ed.), ASM Press, Washington DC., pp 104.

- Riffkin, P. A., Quigley, P. E., and Cameron, F. J.** 1996. Inhibitory effects of Brassica roots exudates on Rhizobia. In: MacEwan, R. J., Carter, M. R. (eds). Proceedings of the International Symposium, Advances in Soil Quality for Land Management: Science, Practice, Centre for Environmental Management, University of Ballarat, p. 138.
- Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Dazzo, F. B., Kroppendstedt, R. M., Martínez-Molina, E., Gillis, M., and Velázquez, E.** 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. Syst. Appl. Microbiol. **26**: 47-53.
- Robertsen, B., Aiman, P., Darvill, A., McNeil, M. and Albertein, 1981.** The structure of acid extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. Plant Physiol. **67**: 389-700.
- Robleto, E. A., Scupham, A. J., and Triplet, E. W.** 1997. Trifolitoxin production in *Rhizobium etli* strain CE3 increases competitiveness for rhizosphere growth and root nodulation of *Phaseolus vulgaris* in soil. MPMI **10**: 228-233.
- Robleto, E. A., Kmiecik, K., Oplinger, E. S., Nienhuis, J., and Triplet, E. W.** 1998. Trifolitoxin production increases nodulation competitiveness for *Rhizobium etli* strain CE3 under agricultural conditions. Appl. Env. Microbiol. **64**: 2630-2633.
- Rolfe, B. G.** 1988. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. Biofactors 1: 3-10.
- Rolfe, B. G., Carlson, R. W., Ridge, R. W., Dazzo, F., Mateos, P., and Pankhurst, C.** 1996. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *R. leguminosarum* bv *trifolii*. Aust. J. Plant Physiol. **23**: 285-303.
- Rollin, D., Pfeffer, P., Osman, S., Szwergold, B., Kappler, F., and Benesi, A.** 1992. Structural studies of a phosphocholine substituted $\beta(1-3)$ $\beta(1-6)$ macrocyclic glucan from *B. japonicum* USDA 110. Biochim. Biophys. Acta **1116**: 215-225.

- Ronson, C. W., Bosworth, A., Genova, M., Gudbransen, S., Hankinson, T.** 1990. Field release of genetically engineered *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains. Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. New York. pp: 397-403.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold. Spring. Harbor. N.Y.: Cold. Spring. Harbor Laboratory Press.
- Sadowski, M. J., and Graham, P. H.** 1998. Soil Biology of *Rhizobiaceae*. En: The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 155-172.
- Salzwedel, J. L., and Dazzo, F. B.** 1993. pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. Mol Plant-Microbe Interact. **6**: 127-134.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*, Gene **145**: 69-73.
- Sessistch, A., Wilson, K. J., Akkermans, A., and De Vos, W.** 1996. Simultaneous detection of different *Rhizobium* strains marked with either *Escherichia coli gusA* gene or the *Pyrococcus furiosus celB* gene. Appl. Env. Microbiol. **62**: 4191-4194.
- Sessitsch, A., Jjemba, P. K., Hardarson, G. A., Akkeremans, A. D., and Wilson, K. J.** 1997. Measurement of the competitiveness index of *R. tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the *gusA* gene. Soil Biol. Biochem. **29**: 1099-1110.
- Sharma, P. K., Anand, R. C., and Lakshminarayana, K.** 1991. Construction of Tn5 tagged mutants of *Rhizobium sp. (Cicer)* for ecological studies. Soil Biol. Biochem. **23**: 881-885.

- Skorupska, A., Derylo, M., Lorkiewicz, Z.** 1985. Role of noncarbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Arch. Microbiol.* **143**: 307–310.
- Skorupska, A., Bialek, U., Urbanik-Sypniewska, T., and Lammeren, A.** 1995. Two types of nodules induced on *Trifolium pratense* by mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* deficient in exopolysacchride production. *J. Plant Physiol.* **147**: 93-100.
- Slattery, J. F., Coventry, D. R., Slattery, W. J.** 2001. Rhizobial ecology as affected by the soil environment. *Aust. J. Experim. Agricul.* **41**: 289-298.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gramnegative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Simon, T., Kálalová, S., and Petrzik, K.,** 1996. Identification of *Rhizobium* strains and evaluation of their competitiveness. *Folia Microbiol.* **1**: 65-72.
- Smit, G., Lugtenberg, B. J. J., and Kijne, J. W.** 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* **6**: 2897-2903.
- Soedarjo, M., and Borthakur, D.** 1998. Mimosine, a toxin produced by a tree-legume *Leucaena* provides a nodulation competition advantage to mimosine-degrading *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1605-1613.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J.** 1985. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Niftal, University of Hawaii, Paia (Hawaii).
- Soto, M. J., Lepek, V., Lopez-Lara, I. M., Olivares, J., and Toro, N.** 1992. Characterization of a *Rhizobium meliloti ndvB* mutant and a symbiotic revertant that regains wild-type properties. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 11-14.
- Spaink, H. P., Wijffelman, C. A., Okker, R. J., and Lugtenberg, B. J.** 1989. Localization of functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nodD* genes. *Plant Mol. Biol.* **12**: 59-73.
- Spaink, H. P.** 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**: 257-288.

- Sprent, J. L.** 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytologist*. **111**: 129-153.
- Sprent, J. L., and Raven, J.** 1992. Evolution of nitrogen fixing symbiosis. In: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stacey, R. Burris and H. Evans, eds. Chapman and Hall, New York, p461-496.
- Stacey, G., So, J. S., Roth, L. E., Lakshmi, S. K., and Carlson, R. W.** 1991. A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 332-340.
- Stafford, H. A.** 1997. Roles of flavonoids in symbiotic and defense reactions in legume roots. *Bot. Rev.* **63**: 27-39.
- Stanfield, S., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D. and Ditta, G.** 1988. The *ndv* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for (1-2) glucan production and has homology to the ATP-binding export protein H1yB. *J. Bacteriol.* **170**: 3523-3530.
- Storz, G., and Hengge-Aronis.** 2000. Bacterial stress responses. ASM Press. Chapter 8, 117-127.
- Streeter, J. G.** 1994. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can. J. Microbiol.* **40**: 513-522.
- Streit, W., Kosh, K., and Werner, D.** 1992. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (GUS) gene fusions. *Biol. Fertility of Soils.* **14**: 140-144.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., García, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, I., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., and Dreyfus, B.** 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* **183**: 214-220.
- Taurian, T., Aguilar, M., and Fabra, A.** 2002. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis* 33: 59-72. ISSN: 0334-5114. Ed. Balaban Publishers, Israel.

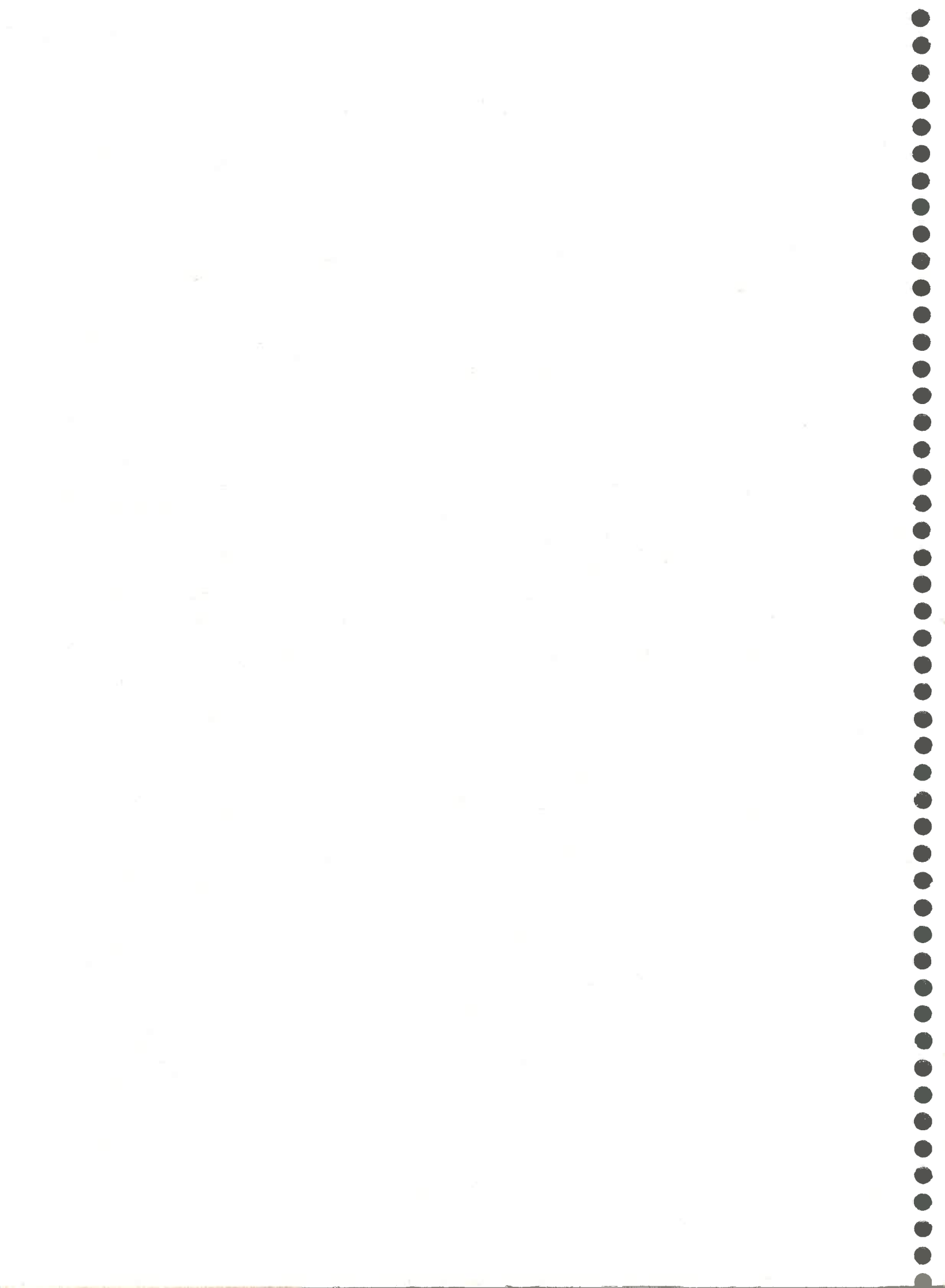
- Taurian, T., Ibáñez, F., Fabra, A., and Aguilar, M.** 2005. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean Soils. Plant and Soil (in press) Ed: Springer, Netherlands.
- Tavernier, P., Portaris, J. C., Nava Saucedo, J., Courtois, J., Courtois, B., and Barbotin, J. N.** 1997. Exopolysaccharides and poly- γ -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. Appl. Env. Microbiol. **63**: 21-26.
- Tavernier, P., Besson, I., Portaris, J. C., Courtois, J., Courtois, B., and Barbotin, J. N.** 1998. *In vivo* ^{13}C -NMR study of exopolysaccharide synthesis in the *Rhizobium meliloti* Su47 strain. J. Chem. Phys. PCB **95**: 256-259.
- Toro, N.** 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium* – legume symbiosis. World J. Microbiol. Biotechnol. **12**, 157-162.
- Triplett, E. W. y Sadowsky, M. J.,** 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. Annu. Rev. Microbiol. **46**: 399-428.
- Triplett, E. W., Breil, B. T., and Splitter, G. A.** 1994. Expression of *tfx* and sensitivity to the rhizobial antipeptide trifolitin in a taxonomically distinct group of α -proteobacteria including the animal pathogen *Brucella abortus*. Appl. Env. Microbiol. **60**: 1705-1713.
- Tsai, C., and Frash, C.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **119**: 115-119.
- Tung, W. L., and Chow, K. C.** 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. Trends. Genet. **11**: 128-129.
- Turner, S. L., and Young, P. J.** 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. Mol. Biol. Evol. **17**:309–319.
- Urzainiqui, A., and Walker, G. C.** 1992. Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants. J. Bacteriol. **174**: 3403-3406.
- Uttaro, A. D., Cangelosi, G. A., Geremia, R. A., Nester, E. W., and Ugalde, R. A.** 1990. J. Bacteriol. **172**: 1640-1646.
- van Dillewijn, P., Soto. M., Villadas, P., and Toro, N.** 2001. Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified

- to be more competitive for alfalfa nodulation. *Appl. Env. Microbiol.* **67**: 3860-3865.
- van Workum, Canter-Cremers, H. C. L., Wijfies, A. H., van der Kolk, C., W. A. T., Wijffelman, C. A., and Kijne, J. W.** 1997. Cloning and characterization of four genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* involved in exopolysaccharide production and nodulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**: 290-301.
- van Workum, W. A. T., van Slageren, S., van Brussel, A. A. N., and Kijne, J. W.** 1998. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-determining molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *MPMI* **11**: 1233-1241.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W-M., de Vos, P., and Willems, A.** 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 507-512.
- van Rhijn, P., Goldberg, R. B., and Hirsch, A. M.** 1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* **10**: 1233-1250.
- van Rhijn, P., Fujishige, N. A., Lim, P. O., and Hirsch, A. M.** 2001. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Physiol.* **126**: 133-144.
- Velásquez, E., Mateos, F., Velasco, N, Santos, P., Burgos, A., Villadas, P., Toro, X., and Martínez-Molina, E.** 1999. Symbiotics characteristics and selection of autochthonous strains of *S. meliloti* populations in different soils. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 1939-1947.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., and Lupski, J. R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**: 25-40.
- Vickery, M.L., and Vickery, B.** 1981 *Secondary Plant Metabolism*. Macmillan Press, London, United Kingdom. ISBN 0-33327018-5.

- Vincent, J. M.** 1970. En "Manual Práctico de la Rizobiología" Editorial Hemisferio Sur.
- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P.A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H., and Tilman, G. D.** 1997. Human alteration of global nitrogen cycle: causes and consequences. Science office. Issues in Ecol. Issue 1.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R.** 1991. Chelex 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BoiTechniques*. **10**: 506-53.
- Wang, Y., and Hollingsworth, R. I.** 1994. The structure of the O-antigenic chain of lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4s. *Carbohydr. Res.* **260**: 305-317.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J.,** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Wang Lai-Xi, Wang, Y., Pellock, B. and Walker, G.** 1999. Structural Characterization of the Symbiotically Important Low – Molecular – Weight Succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **181**: 6788-6786.
- Wei, G., Song, S., Lin, L., and Her, G.** 1996. Structural studies of extracellular polysaccharide produced by *Rhizobium fredii* Tu6, a polysaccharide with nonasaccharide repeating units. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **37**: 127-131.
- Weisburg, W. G., Barns, M. S., Pelletier, D. A., and Laine, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Wielbo, J., Mazur, A., Król, J., Marczak, M., Kutkowska, J., and Skorupska, A.** 2004. Complexity of phenotypes and symbiotic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* exopolysaccharide mutants. *Arch. Microbiol.* **182**: 331-336.
- Willems, A., and Collins, M. D.** 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 305- 313.

- Wexler, M., Gordon, D., and Murphy, P.J.** 1995. The distribution of inositol rhizopine genes in *Rhizobium* populations. *Soil. Biol. Biochem.* **27**: 531-537.
- Yannisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Young, J. P. W., Downer, H. L., and Eardly, B. D.** 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**: 2271 - 2277.
- Young, J. P. W., and Haukka, K. E.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133**: 87 - 94.
- Zhang, Y., Hollingsworth, R. J., and Priefer, U. B.** 1992. Characterization of structural defects in the lipopolysaccharides of symbiotically impaired *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* VF-39 mutants. *Carbohydr. Res.* **231**: 261-271.
- Zorreguieta, A., and Ugalde, R.** 1985. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium spp.* of a 325 kDa protein intermediate in cyclic β -D-(1-2) glucan biosynthesis. *J. bacteriol.* **167**: 947-951.
- Zorreguieta, A., Geremia, R., Cavagnac, S., Gangelosi, G., Nester, E., and Ugalde, R.** 1988. Identification of the product of an *A. tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 121-127.

ANEXO



➤ Características genotípicas de microsimbiontes nativos de maní.

NET30: El análisis de la secuencia de 1378 pb del gen 16S rARN del aislamiento de crecimiento rápido NET30 (número de acceso GenBank AY427206) permitió demostrar que posee un 99% de homología (11 nucleótidos diferentes) con respecto a la secuencia correspondiente a la cepa H152 de la especie *Rhizobium giardinii*, así como también elevado porcentaje de similitud con otras especies de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Taurian y col., 2003). La especie *R. giardinii* fue descrita por Amarger y col. (1997), para asignar posiciones filogenéticas a aislamientos obtenidos a partir de *Phaseolus vulgaris* recolectados de suelos franceses.

NCHA22: El análisis de la secuencia de 1500 pb del gen 16S rARN del aislamiento de crecimiento rápido NCHA22 permitió demostrar una elevada homología con diferentes cepas de la especie *Rhizobium tropici* IIB. La secuencia del gen 16S ARNr del aislamiento NCHA22 difiere de la secuencia correspondiente al aislamiento *R. tropici* IIB CIAT166 en sólo 5 nucleótidos (Fernando Ibáñez, Tesis Doctoral). *Rhizobium tropici* es una especie rizobiana de amplio rango de huésped capaz de formar nódulos en *Leucaena leucocephala* y *Phaseolus vulgaris* entre otras leguminosas huésped. La especie tipo del grupo *R. tropici* IIB es la cepa CIAT899, que fue originalmente aislada de suelos ácidos de Brasil y Colombia (Martínez-Romero y col., 1991).

El porcentaje de homología entre los genes 16S ARNr de los aislamientos NET30 y NCHA22 es del 97%.

➤ Características fenotípicas de los microsimbiontes de maní:

Las características fenotípicas de los aislamientos NET30 y NCHA22 se muestran en tabla 1.

Tabla 1. Características fenotípicas de los microsimbiontes nodulantes de maní.

Aislamiento	Veloc. de crecim.	Tipo de Colonia	Prod. de EPS	Utilización de distintas fuentes de Carbono	Tolerancia a Acidez		Tolerancia al NaCl			Solubil. de fosfato tricálcico
					pH 7	pH 5	0.17 M	0.34 M	0.68 M	
NET30	rápido	Blancas, opacas y acuosas	copioso	Utiliza mono y disacáridos, polialcoholes	+	-	+	-	-	+
NCHA22	rápido	Acuosas blancas y opacas	copioso	Utiliza mono y disacáridos, polialcoholes	+	+	+	+	-	+

➤ Eficiencia Simbiótica de los microsimbiontes de maní.

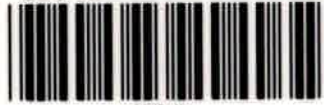
Los datos que se indican en tabla 2 demuestran la eficiencia simbiótica de los aislamientos de crecimiento rápido (NET30 y NCHA22) y de la cepa comercial *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144, en la fijación biológica de nitrógeno en maní, respecto de plantas controles sin inocular y fertilizadas.

Tabla 2: Eficiencia simbiótica de NET30, NCHA22 y *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144.

Tratamientos	PARÁMETROS AGRONÓMICOS		PARÁMETROS SIMBIÓTICOS		
	Cont. Nitrógeno mgN/planta	Peso Seco Aéreo (PSA)	Nódulos totales	% Nódulos rojos	Peso seco nódulos (g)
NET30	34.4 ± 0.18*	1.35 ± 0.18*	29 ± 9	99 ± 1	0.009 ± 0.003
NCHA22	41.53 ± 6.00*	0.992 ± 0.142	38 ± 7	67 ± 9	0.012 ± 0.003
<i>B. sp</i> SEMIA 6144	51,28±10,02*	1,272 ± 0,156*	33±10	77 ± 8	0,028 ±0,008
Control sin inocular	19,31 ± 1,25	0,892 ± 0,09	-	-	-
Control fertilizado	45,54 ± 3,80	1,431 ± 0,127	-	-	-

Los datos representan la media ± E. S. de 4 – 6 determinaciones *p< 0.05

U.N.R.C.
Biblioteca Central



62166

62166