

Tesis de Posgrado

Metabolismos de alfa y beta-glucanos en bacterias que interaccionan con plantas

Estrella, María Julia

2003

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

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

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

Cita tipo APA:

Estrella, María Julia. (2003). Metabolismos de alfa y beta-glucanos en bacterias que interaccionan con plantas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3672_Estrella.pdf

Cita tipo Chicago:

Estrella, María Julia. "Metabolismos de alfa y beta-glucanos en bacterias que interaccionan con plantas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3672_Estrella.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas
Instituto Tecnológico de Chascomús
IIB – INTECH

Metabolismo de α y β -glucanos en bacterias
que interaccionan con plantas

Tesista: Lic María Julia Estrella

Director: Dr Alberto Alvaro Iglesias

Director Asistente: Dra Nora Iñón de Iannino

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

2003

3672

Agradecimientos

Al Dr. Alberto Iglesias, por su presencia en los momentos importantes, por confiar en mí y por su invaluable labor como Director de tesis.

A la Dra Nora Iñón por su valioso desempeño en la co-dirección de la Tesis. Por su dedicación y apoyo constante que fueron fundamentales para lograr este trabajo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por el apoyo económico brindado.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y a la mayoría de sus profesores que contribuyeron de manera significativa a mi formación científica.

Al Dr Oscar Ruiz, por su amistad sincera y apoyo incondicional y también por su lucha y garra constantes a lo largo de todos estos años.

Al Dr Luis Díaz, por estar siempre cuando se lo necesita.

Al Dr Ugalde, por su entusiasmo y apoyo en mis primeros tiempos de becaria.

Al Dr Gomez Casati, por su valiosa ayuda en la realización de algunos experimentos y por su colaboración en la discusión, redacción e impresión de la Tesis.

Al Señor José Luis Burgos, por su constante ayuda en la realización de la mayoría de los ensayos realizados para la Tesis.

A la Dra Busi, por su amistad, apoyo y empuje constantes, particularmente en la última etapa de impresión de la Tesis, y por contener su particular carácter durante estos últimos meses.

A Analía por brindarme su apoyo desde hace varios años.

A Anita, por sus prolongadas y enriquecedoras charlas.

A María, por su colaboración invaluable en los comienzos de algunos experimentos relacionados con la Tesis.

A Caudita por brindarme su apoyo en estos últimos años.

A todos mis compañeros del laboratorio, por su apoyo constante y buen ánimo que colaboraron para que terminara la Tesis.

A todos aquellos compañeros del IIB-INTECH que me apoyaron en distintos momentos durante todos estos años, y que hicieron posible que realizara este trabajo.

A mis amigos

A mi madre Josefina y a mis hermanos Juan y María por estar y apoyarme siempre.

A mi Padre, por darme fuerzas desde allá lejos.

A mis dos amores Fer y Luli, por darme todo su cariño, apoyo y fuerzas para continuar en los momentos difíciles.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis fueron dados a conocer en distintas publicaciones y reuniones científicas.

Presentaciones a congresos nacionales

Estrella, M J, Iñón de Iannino, N and Ugalde, R A (1995). "Síntesis de Glucanos Cíclicos en *Rhizobium loti*". XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Villa Giardino, Córdoba

Estrella, M.J.; Gómez Casati, D.F.; Meyer, C.R. and Iglesias, A.A 2002. Site-directed mutagenesis of a conserved regulatory region of *A. tumefaciens* ADPGlc PPase: The role of arginines 32, 33 and 45 in allosteric modulation. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Carlos Paz, Argentina

Publicaciones de Congresos

Estrella M.J.; Gómez Casati D.F.; Meyer C.R. & Iglesias A.A. Site-directed mutagenesis of a conserved regulatory region of *A. tumefaciens* ADPGlucose Pyrophosphorylase: The role of arginines 32, 33 and 45 in allosteric modulation. *Biocell*, vol 26, suplement III, 2002. In XXXVIII Annual Meeting SAIB, Villa Carlos Paz, Córdoba

Publicaciones

Estrella M J, Pfeffer P, Brouillette J, Ugalde R & Iñón de Iannino N. Biosynthesis and structure of cell associated glucans in the slow growing *Rhizobium loti* strain 2309. *Symbiosis*, vol 29, 173-199, 2000.

Estrella M.J.; Gómez Casati D.F.; Meyer C.R. & Iglesias A.A. Site-directed mutagenesis of a conserved regulatory region of *A. tumefaciens* ADPGlc PPase: The role of arginines 32, 33 and 45 in allosteric modulation. Manuscrito en preparación.

Abreviaturas

3PGA	3-fosfoglicerato
ác. acético	ácido acético
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADP	adenosina difosfato
ADPGlc	ADPGlucosa
ADPGlc PPasa	ADPGlucosa pirofosforilasa
AMP	adenosina monofosfato
AMPC	AMP cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BE	enzima ramificante
BSA	albúmina sérica bovina
Ciclo del TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CRP	proteína receptora del AMP cíclico
ddNTP	dideoxinucleótidos
<i>DEAE-Sephadex</i>	dietilaminoetil-sephadex
<i>DEAE-Sepharose</i>	dietilaminoetil-sepharose
Dnasa	desoxiribonucleotidasa
dNTPs	desoxinucleótidos
DTT	ditiotreitol
ED	Entner-Doudoroff
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
EPS	exopolisacárido
Fru 1,6 bisP	Fructosa 1,6 bis fosfato
Fru 6P	Fructosa 6 fosfato
GABA	ácido gama-amino butírico
Glc 6P	Glucosa 6 fosfato
Glc1P	Glucosa 1 fosfato
GOGAT	glutamato sintetasa
GS	glutamina sintetasa
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico
	de alta resolución por detección
	amperométrica pulsada
	cromatografía líquida de alta
	resolución
HPLC	coeficiente de partición
Kav	kilodalton
KDa	2-ceto-3-deoxioctonato
KDO	lipoquitoligosacáridos
LCOs	especies de <i>Lotus</i>
<i>Lotus</i> spp	lipopolisacárido
LPS	cloruro de magnesio
MgCl	ácido 3-[N- morpholino]
MOPS	propanesulfónico
	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	(forma reducida)
	nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	

NMR	fosfato (forma reducida)
OGDH	resonancia magnética nuclear
PCR	2-oxoglutarato deshidrogenasa
PEG	reacción en cadena de la polimerasa
PEP	polietilén glicol
PEPCK	fosfoenolpiruvato
Pgm	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGO	Fosfoglucomutasa
PHB	fenilglioxal
Pi	Polihidroxibutirato
PLP	ortofosfato inorgánico
PMSF	piridoxal 5-fosfato
PPi	Fenil- metil- sulfonil- fluoruro
RNAsa	pirofosfato inorgánico
SDS	Ribonucleotidasa
SS	dodecil sulfato de sodio
TBE	Sacarosa sintasa
TCA	Tris-borato-EDTA
Tris	ácido tricloroacético
UDPGlc	tris (hidroximetil) aminometano
VPP	UDPGlucosa
	vía de las pentosas fosfato

INDICE

PAGINA

INTRODUCCIÓN GENERAL

1

1. LAS INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS

1

1.1. TIPOS DE INTERACCIONES

1

1.1.1. LAS SIMBIOSIS PARASÍTICAS

1

1.1.2. LAS SIMBIOSIS MUTUALISTAS

2

1.1.2.1. Tipos de simbiosis mutualistas

2

1.1.2.2. La importancia ecológica y agronómica de las simbiosis mutualistas en la fijación de nitrógeno.

2

1.1.2.3. SIMBIOSIS LEGUMINOSA- RIZOBIO

3

1.1.2.3.1. Desarrollo y función del nódulo

5

1.1.2.3.1.1. Iniciación

5

1.1.2.3.1.2. Invasión del nódulo

6

1.1.2.3.1.3. Maduración y senescencia del nódulo

7

1.1.2.3.2. Tipos de nódulos

8

1.1.2.3.3. METABOLISMO DEL RIZOBIO Y DEL BACTEROIDE

11

1.1.2.3.3.1. Utilización de fuentes de carbono

11

1.1.2.3.3.2. Fijación biológica de nitrógeno

11

1.1.2.3.3.3. Obtención de energía vía el ciclo del TCA

12

1.1.2.3.3.4. Regulación del ciclo del TCA

14

1.1.2.3.3.5. Polímeros de reserva

15

1.1.2.3.3.5.1. PHB

17

1.1.2.3.3.5.2. Glucógeno

18

1.1.2.3.4.- La simbiosis mutualista *Lotus* spp- rizobio

21

1.1.2.3.4.1.- Las especies de *Lotus* y su importancia agronómica

21

1.1.2.3.4.2.- El rol de los flavolanos de especies de *Lotus* en el establecimiento de la simbiosis con rizobios.

23

2. POLISACÁRIDOS BACTERIANOS

26

2.1. POLISACÁRIDOS BACTERIANOS QUE PARTICIPAN EN LA SIMBIOSIS MUTUALISTA LEGUMINOSA-RIZOBIO

27

2.1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

27

2.1.1.1. EPS

27

2.1.1.2. LPS

29

2.1.1.3. β -glucanos cíclicos

29

2.2. BIOSÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS EN RIZOBIOS

33

2.2.1. Biosíntesis de glucanos cíclicos

35

2.2.1.1. Genes estructurales involucrados en la síntesis de glucanos cíclicos

37

2.2.2. Biosíntesis de glucógeno

38

2.2.2.1. Genes estructurales involucrados en el metabolismo de glucógeno

41

2.2.2.2. Regulación de la síntesis de glucógeno

44

2.2.2.2.1. Estructura y regulación de la ADPGlc PPasa

44

2.2.2.2.2. Importancia del extremo N-terminal en la regulación alostérica de la ADPGlc PPasa

47

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1

4

Tabla 2

24

Tabla 3

45

Figura 1

10

Figura 2	13
Figura 3	16
Figura 4	20
Figura 5	25
Figura 6	31
Figura 7	32
Figura 8	34
Figura 9	36
Figura 10	40
Figura 11	43
Figura 12	49
OBJETIVOS GENERALES	50
CAPÍTULO I. BIOSÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GLUCANOS CÍCLICOS EN RIZOBIOS QUE ESTABLECEN SIMBIOSIS CON ESPECIES DEL GÉNERO <i>LOTUS</i>.	51
INTRODUCCIÓN	51
MATERIALES Y METODOS	53
MM. 1.- Cepas bacterianas	53
MM. 2.- Condiciones de cultivo	53
MM. 3.- Medios de cultivo utilizados	53
MM. 4.- Extracción de glucanos asociados a células	53
MM. 5.- Caracterización de glucanos asociados a células	53
MM. 6.- Preparación de membranas internas	54
MM. 7.- Síntesis <i>in vitro</i> de glucanos	55
MM. 8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida	55
MM. 9.- TRATAMIENTOS QUÍMICOS	55
MM. 9. 1.- Hidrólisis ácida total	55
MM. 9. 2.- Hidrólisis ácida parcial	56
MM. 9. 3.- Hidrólisis alcalina	56
MM. 10.- Cromatografías y electroforesis	56
MM. 10. 1.- Cromatografía en capa delgada (TLC)	56
MM. 10. 2.- Cromatografía en columna de <i>DEAE-Sephadex</i>	56
MM. 10. 3.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	56
MM. 10. 4.- Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución por detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	57
MM. 11.- Reducción con borohidruro de sodio	57
MM. 12.- Degradación de Smith	57
MM. 13.- Digestión con laminarinasa	58
MM. 14.- Dosaje de carbohidratos	58
MM. 15.- Espectroscopía de masa FAB	58
MM. 16.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)	58
MM. 17.- ENSAYOS DE INTERACCION PLANTA-BACTERIA	58
MM. 17. 1.- Material vegetal.	58
MM. 17. 2.- Ensayo de nodulación	59
MM. 17. 3.- Medición de actividad de nitrogenasa	59
MM. 18.- MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	59

MM. 18. 1.- Purificación de ADN genómico	59
MM. 18. 2.- Amplificación de ADN de rizobios a partir de secuencias repetitivas palindrómicas (rep) por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	60
MM. 18. 3.- Amplificación del ADN ribosomal de 16S (16S rDNA) por PCR	60
MM. 18. 4.- Análisis de los fragmentos de restricción del ADNr 16S	61
RESULTADOS	62
R. 1- CARACTERIZACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS GLUCANOS CICLICOS ACUMULADOS POR LA CEPA DE CRECIMIENTO LENTO DE <i>B. LOTI</i> NZP 2309. COMPARACION CON LA ESTRUCTURA DE LOS GLUCANOS CICLICOS PRODUCIDOS POR <i>B. JAPONICUM</i> USDA 110	62
R. 1. 1.- Separación de los glucanos acumulados <i>in vivo</i> en una columna de <i>Bio-Gel P4</i> preparativa.	62
R. 1. 2.- Identificación del tipo de enlace que está formando los diferentes compuestos acumulados <i>in vivo</i> eluidos de la columna de <i>Bio-Gel P4</i>	64
R. 1. 3.- Determinación del grado de polimerización y estructura cíclica o lineal de los glucanos presentes en las muestras 3, 4 y 5, por espectroscopía de masa FAB	68
R. 1. 4.- Identificación de glucanos aniónicos en los productos acumulados <i>in vivo</i>	70
R. 1. 5.- Separación de los glucanos cíclicos presentes en la muestra 3 por Cromatografía de intercambio aniónico.	72
R. 1. 6.- Identificación de la proporción de enlaces glucosídicos $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3)$ y presencia de ramificaciones en el principal glucano cíclico detectado en la muestra 3, por espectroscopía de RMN	74
R. 2.- ESTUDIO DE LA SÍNTESIS <i>IN VITRO</i> DE GLUCANOS CÍCLICOS DE <i>B. LOTI</i> NZP 2309	77
R. 2. 1.- Separación de los productos sintetizados <i>in vitro</i> en una cromatografía de filtración molecular	79
R. 2. 2.- Identificación del tipo de enlace formado por los productos sintetizados <i>in vitro</i>	82
R. 2. 2. 1.- Hidrólisis total y parcial de los productos solubles	82
R. 2. 3.- Determinación de la estructura cíclica en los productos sintetizados <i>in vitro</i> por la cepa <i>NZP 2309</i>	82
R. 2. 4.- Identificación de ramificaciones en la estructura cíclica del glucano sintetizado <i>in vitro</i> por Degradación de Smith.	85
R. 2. 5.- Caracterización de productos insolubles en TCA obtenidos de la síntesis <i>in vitro</i>	85
R. 3.- IDENTIFICACION DEL TIPO DE GLUCANO QUE PRODUCEN LAS CEPAS DE <i>M. LOTI</i> NZP 2213 Y NZP 2037	88
R. 3. 1.- Separación de los productos acumulados <i>in vivo</i> en una cromatografía de filtración molecular	88
R. 3. 2.- Identificación de productos aniónicos acumulados <i>in vivo</i>	90
R. 3. 3.- Identificación del tipo de enlace que forman los productos acumulados <i>in vivo</i>	94
R. 3. 4.- Síntesis <i>in vitro</i> de glucanos	94
R. 3. 5.- Identificación del tipo de enlace formado por los productos sintetizados <i>in vitro</i>	96
R. 3. 5. 1.- Hidrólisis total y parcial de los productos solubles	96
R. 3. 6.- Identificación de proteínas intermediarias en la síntesis de glucanos	98
R. 4.- CAPACIDAD DE NODULACION Y FIJACION DE NITROGENO DE CEPAS DE RIZOBIOS QUE ESTABLECEN SIMBIOSIS CON <i>LOTUS</i> SPP	98

DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES GENERALES	105
TABLAS Y FIGURAS	
Tabla 1. 1	76
Tabla 1. 2	100
Figura 1. 1	63
Figura 1. 2	65
Figura 1. 3	66
Figura 1. 4	67
Figura 1. 5	69
Figura 1. 6	71
Figura 1. 7	73
Figura 1. 8	75
Figura 1. 9	78
Figura 1. 10	80
Figura 1. 11	81
Figura 1. 12	84
Figura 1. 13	87
Figura 1. 14	89
Figura 1. 15	91
Figura 1. 16	93
Figura 1. 17	95
Figura 1. 18	97
CAPITULO II.- REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO EN BACTERIAS QUE INTERACCIONAN CON PLANTAS	107
INTRODUCCIÓN	107
Figura 2. 1	108
PARTE EXPERIMENTAL	110
MM. 1. -Cepas bacterianas	110
MM. 2.- Plásmidos	110
MM. 3.- Condiciones de cultivo	110
MM. 4.- Medios de cultivo utilizados	110
MM. 5.- METODOS BIOQUÍMICOS	110
MM. 5. 1.- Medición de actividad de ADPGlc PPasa en nódulos de <i>Glycine max</i>	110
MM. 5. 2.- Ensayo de la ADPGlc PPasa	111
MM. 5. 3.- Purificación parcial de la ADPGlc PPasa de <i>B. loti</i> NZ P2309	112
MM. 5. 4.- Purificación de las distintas mutantes de ADPGlc PPasa de <i>A. tumefaciens</i> expresadas en <i>E. coli</i>	112
MM. 5. 5.- Determinación de los efectores alostéricos de la ADPGlc PPasa de <i>B. loti</i> NZP2309	113
MM. 5. 6.- Estudios cinéticos de las mutantes de ADPGlc PPasa de <i>A. tumefaciens</i> en la región regulatoria	113
MM. 5. 7.- Cuantificación de proteínas	114

MM. 6.- ENSAYOS DE INTERACCION PLANTA-BACTERIA	114
MM. 6. 1.- Material vegetal	114
MM. 6. 2.- Ensayo de nodulación	114
MM. 6. 3.- Ensayo de reducción de acetileno	114
MM. 7.- METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	114
MM. 7. 1.- Purificación de ADN genómico	114
MM. 7. 2.- Purificación de ADN plasmídico	115
MM. 7. 3.- Marcado de sonda por <i>Random Priming</i>	115
MM. 7. 4.- Transferencia de ADN a filtros de nylon (<i>southern blot</i>) e hibridización	116
MM. 7. 5.- Electroforesis en geles de agarosa	116
MM. 7. 6.- Obtención de una mini-biblioteca de ADN genómico de <i>B. loti</i> NZP2309	116
MM. 7. 7.- Identificación de una región que contiene el gen <i>glgC</i> en <i>B. loti</i> por <i>Dot Blot</i>	117
MM. 7. 8.- Mutagénesis sitio-dirigida de la ADPGlc PPasa de <i>A. tumefaciens</i>	117
R. 1.- - ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN Y LA SECUENCIA DE LOS GENES DE <i>BRADYRHIZOBIUM LOTI</i> QUE PARTICIPAN EN LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO, Y COMPARACIÓN DE LOS MISMOS CON LOS DE OTROS RIZOBIOS.	119
R. 1. 1.- Clonado y caracterización de una región que codifica para los genes <i>glgC</i> y <i>glgA</i> de <i>B. loti</i> NZP2309	119
R. 1. 2.- Análisis de las secuencias aminoacídicas que codifican para las proteínas GLGC (ADPGlc PPasa) y GS (Glucógeno sintasa)	125

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 2. 1	125
Figura 2. 2	120
Figura 2. 3	121
Figura 2. 4	123
Figura 2. 5	124
Figura 2. 6	127
Figura 2. 7	128
Figura 2. 8	129

R. 2. - IDENTIFICACIÓN DE LOS REGULADORES ALOSTÉRICOS DE LA ADPGlc PPASA DE <i>B. LOTI</i>. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RELATIVO DE LA ENZIMA BACTERIANA Y VEGETAL EN NÓDULOS	138
R. 3.- ESTUDIO DEL ROL QUE DESEMPEÑAN LOS RESIDUOS DE ARGININA LOCALIZADOS EN LA REGIÓN REGULATORIA ALTAMENTE CONSERVADA DE LAS ADPGlc PPASAS REGULADAS POR FRU-6P Y PIRUVATO, UTILIZANDO COMO MODELO EXPERIMENTAL LA ENZIMA DE <i>A. TUMEFACIENS</i>	140
R. 3. 1.- Efecto de las sustituciones aminoacídicas sobre los parámetros cinéticos de la ADPGlc PPasa para los sustratos ATP y Glc 1P	141
R. 3. 2.- Efecto de las sustituciones aminoacídicas sobre los parámetros cinéticos de regulación alostérica de las ADPGlc PPasas mutadas	145

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 2. 2	138
Tabla 2. 3	139

Tabla 2. 4	143
Tabla 2. 5	144
Tabla 2. 6	148
Tabla 2. 7	149
Figura 2. 9	140
Figura 2. 10	147
Figura 2. 11	150
DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES GENERALES	156
COMENTARIO GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS	158
RESUMEN	160
BIBLIOGRAFÍA	162

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.- LAS INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS

Las plantas, al igual que todos los seres vivos, interactúan de diversas maneras con el medio ambiente. En particular, las mismas establecen relaciones con los distintos tipos de organismos que se encuentran en su entorno, revistiendo especial interés para este trabajo de tesis las interacciones entre plantas superiores y microorganismos.

1. 1.- TIPOS DE INTERACCIONES

Si bien existe en la literatura una tendencia a usar el término simbiosis para hacer referencia a interacciones en las que los dos organismos involucrados resultan beneficiados, en su sentido más amplio dicha palabra se refiere a organismos que viven juntos. Esta definición amplia del término simbiosis, incluye entonces a interacciones de tipo mutualistas, comensalistas y parasíticas (Parniske, 2000). De este modo, se consideran asociaciones mutualistas a aquellas en las que se benefician ambos organismos, mientras que en las asociaciones comensalistas sólo se beneficia uno de los organismos y el otro no se beneficia ni se perjudica. En cuanto a las asociaciones parasíticas, uno de los dos organismos resulta beneficiado y el otro perjudicado (Curtis & Barnes, 1989). La mayoría de las interacciones simbióticas entre plantas superiores y microorganismos son de tipo mutualista y parasítica.

1.1.1.- LAS SIMBIOSIS PARASÍTICAS

Diversos hongos y bacterias pueden establecer simbiosis parasíticas con plantas superiores, las cuales resultan en el desarrollo de enfermedades en la planta hospedante. Frecuentemente, tales enfermedades disminuyen el rendimiento de cultivos de importancia económica, por lo cual representan un serio problema para la producción agropecuaria a nivel mundial (Agrios, 1997). En el caso de los hongos, la capacidad de establecer este tipo de interacciones con plantas no se limita a un grupo taxonómico dado. Por el contrario, todos los taxones de hongos incluyen especies que son patógenas de plantas, existiendo por lo tanto una diversidad muy grande en el tipo de enfermedades producidas por estos organismos (Alexopoulos, 1996).

Las bacterias más conocidas por su capacidad de establecer simbiosis parasíticas con plantas son bacilos Gram negativos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Xanthomonas*, las cuales causan una gran variedad de enfermedades (Agrios, 1997). Una simbiosis parasítica altamente especializada es la establecida entre bacterias del género *Agrobacterium* y diversas especies de dicotiledóneas. La interacción entre *A. tumefaciens* y tales plantas resulta en el desarrollo de la enfermedad comúnmente conocida como de agalla de la corona (Matthysse, 1986; Moore & Cooksey, 1981). En forma semejante, la interacción entre algunas plantas y *A. rhizogenes* resulta en una enfermedad consistente en el desarrollo de raíces adventicias en cabellera (Clare, 1990). Estas bacterias se encuentran dentro de la familia Rhizobiaceae y están estrechamente relacionadas con especies que establecen simbiosis mutualistas, como veremos más adelante (Gualtieri & Bisseling, 2000).

1. 1. 2.- LAS SIMBIOSIS MUTUALISTAS

1. 1. 2. 1.- TIPOS DE SIMBIOSIS MUTUALISTAS

Dentro de las simbiosis de tipo mutualista revisten especial importancia aquellas en las que participan microorganismos que invaden tejidos de la planta hospedante y se asocian íntimamente con ellos. Tales microorganismos son conocidos como endosimbiontes.

Un ejemplo de endosimbiosis mutualista es la establecida entre plantas leguminosas y bacterias Gram negativas que pertenecen al orden Rhizobiales, colectivamente conocidas como rizobios (Pawłowski & Bisseling, 1996). Por otra parte, algunas especies de plantas establecen simbiosis mutualistas, conocidas como actinorrizas, con bacterias Gram negativas filamentosas del género *Frankia* (Benson & Silvester, 1993). En las dos interacciones antedichas, las plantas son provistas de formas reducidas nitrógeno por las bacterias, mientras que estas últimas reciben compuestos carbonados de la planta. Otro tipo importante de endosimbiosis mutualista es la formación de micorrizas, como resultado de la interacción entre diversas especies de plantas superiores y hongos del suelo pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos (Harley & Smith, 1983). En este caso, los hongos proporcionan fósforo y nitrógeno a la planta, mientras que esta última contribuye con fotosintatos que son usados como fuente de carbono por el hongo.

1. 1. 2. 2.- LA IMPORTANCIA ECOLÓGICA Y AGRONÓMICA DE LAS SIMBIOSIS MUTUALISTAS EN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO.

La concentración de algunos nutrientes en el suelo es frecuentemente limitante para el crecimiento de las plantas. En particular, el nitrógeno es el nutriente limitante primario en la mayoría de los ecosistemas terrestres (Vitousek & Howarth, 1991). Numerosos trabajos han determinado que existe una competencia entre plantas y microorganismos por este nutriente (Jackson et al., 1989; Jingguo & Bakken, 1997). Se asume que las plantas solamente pueden acceder al nitrógeno inorgánico del suelo, el cual proviene de la mineralización de la materia orgánica. Los microorganismos son competidores superiores a las plantas en cuanto a la capacidad de acceder a esa fuente de nitrógeno. Esto es debido a que los microorganismos participan en los procesos de mineralización, poseen una gran relación superficie/volumen y una rápida tasa de crecimiento, si se los compara con las raíces de las plantas. Si bien el nitrógeno mineral también puede ser liberado por organismos eucariontes a través de la actividad de exoenzimas, la alta densidad de microorganismos que rodea las raíces de las plantas (rizosfera) determina que exista una competencia muy alta por dicha forma de nitrógeno (Hodge et al., 2000). Aunque algunas plantas pueden incorporar compuestos nitrogenados orgánicos a través de las raíces, las mismas también están sujetas a la competencia con microorganismos que poseen dicha capacidad (Raab et al., 1996).

Los suelos deficientes en nitrógeno pueden ser suplementados con fertilizantes químicos. Sin embargo, la fabricación de los mismos presenta desventajas tales como su alto costo y la producción de residuos que contaminan el medio ambiente (Vitousek et al., 1997).

Por otra parte, el suelo puede recibir aportes naturales de nitrógeno provenientes de la actividad biológica de microorganismos capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio. Tal proceso puede ser llevado a cabo por bacterias de vida libre (Sprent & Sprent, 1990), o bien por bacterias que

establecen simbiosis mutualistas con plantas, siendo estas últimas las que contribuyen en mayor medida al proceso global de fijación de nitrógeno (Gresshoff et al., 1990). De este modo, las asociaciones mutualistas entre plantas y endosimbiontes desempeñan un rol significativo en el desarrollo de la agricultura. En particular, la simbiosis mutualista más relevante por su contribución a la incorporación de nitrógeno al suelo, es la establecida entre plantas leguminosas y rizobios.

1. 1. 2. 3.- SIMBIOSIS LEGUMINOSA- RIZOBIO

Esta simbiosis ha recibido gran atención debido a la importancia ecológica y agronómica de las leguminosas. La familia *Leguminosae* comprende más de 19.000 especies, desde hierbas forrajeras anuales hasta árboles, las cuales crecen en un amplio rango de climas y regiones. Esta familia está integrada por las sub-familias *Papilionoideae*, *Mimosoideae* y *Caesalpinioideae*. Si bien la gran mayoría de los miembros de las dos primeras subfamilias son capaces de establecer simbiosis con rizobios, solamente un género de la subfamilia *Caesalpinioideae* es capaz de establecer este tipo de relaciones endosimbióticas (Doyle, 1994).

Tal como se mencionó anteriormente, los rizobios son bacterias Gram negativas pertenecientes al orden Rhizobiales o subgrupo $\alpha 2$ de protobacterias. Las mismas comprenden distintos géneros de las familias *Bradyrhizobiaceae*, *Rhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Phyllobacteriaceae* (Madigan et al., 2000). Los estudios filogenéticos realizados en estas bacterias basados en la secuencia del ARN ribosomal 16S determinaron que dentro de los rizobios, los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* se encuentran más relacionados entre sí, mientras que los géneros *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* se encuentran más distanciados del resto de los géneros antes mencionados (Gualtieri & Bisseling, 2000).

Por otra parte, la capacidad de establecer simbiosis con rizobios, es exclusiva de las leguminosas, con la excepción del árbol tropical *Parasponia*, perteneciente a la familia *Ulmaceae* (ver Tabla 1)(Appleby et al., 1983).

Tabla 1.- Asociaciones rizobio-leguminosa.

Rizobio	Algunos de sus hospedantes
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> spp, <i>Melilotus</i> spp y <i>Trigonella</i> spp.
<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i>
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv.viciae</i> <i>bv.phaseoli</i> <i>bv.trifolii</i>	<i>Pisum</i> spp, <i>Vicia</i> spp. <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Trifolium</i> spp.
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> spp. <i>Macroptilium</i> spp.
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> , <i>G. orientalis</i>
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Rhizobium</i> sp. cepa NGR234	Leguminosas tropicales y <i>Parasponia</i> spp. (no leguminosa)
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Parasponia</i>)	<i>Parasponia</i> spp. (no leguminosa)
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp.

La asociación entre leguminosas y rizobios generalmente ocurre en la raíz, donde se forman estructuras especializadas denominadas nódulos. Más adelante se describe detalladamente el proceso de desarrollo del nódulo (sección 1.1.2.3.1) y los distintos tipos de nódulos que existen (sección 1.1.2.3.2). Los nódulos formados en los tallos de la planta acuática *Sesbania rostrata* constituyen una excepción a la regla anterior (Dreyfus et al., 1988). En los nódulos, la bacteria reduce el nitrógeno atmosférico a amonio, el cual es exportado a otros órganos de la planta como tal, o bien luego de ser transformado en alanina (Waters et al., 1998). Por otra parte, la planta provee a la bacteria de ácidos carboxílicos que son utilizados como fuente de carbono y energía (Kahan et al., 1998). Estos compuestos son el producto del metabolismo de carbohidratos que provienen de la reducción del dióxido de carbono durante la fotosíntesis.

Generalmente, existe una gran especificidad entre rizobios y leguminosas. Cada rizobio puede formar nódulos solamente con un número restringido de leguminosas y en forma semejante, cada leguminosa forma nódulos con un número restringido de rizobios. A pesar de estas restricciones, existe una gran variabilidad entre las distintas especies de rizobios en relación con su capacidad de formar nódulos. De este modo, existen cepas de amplio rango de hospedante que forman nódulos en distintos géneros de leguminosas, mientras que otras cepas de estrecho rango de hospedante solamente forman nódulos en unos pocos géneros (Young & Johnston, 1989).

1. 1. 2. 3. 1.- Desarrollo y función del nódulo

La ontogenia de nódulos capaces de fijar nitrógeno consta de diversas etapas, cada una de las cuales se describe a continuación. En la sección 1.1.2.3.3. se describen los aspectos metabólicos de la fijación de nitrógeno en nódulos maduros y el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses

1. 1. 2. 3. 1. 1.- Iniciación

Se considera como etapa de iniciación a la que implica el reconocimiento entre ambos simbioses, siendo probablemente la etapa más estudiada de la ontogenia del nódulo. La misma consiste en un intercambio de señales químicas entre la planta y el rizobio. Las raíces de las leguminosas exudan flavonoides específicos que atraen a determinados rizobios (Caetano-Anollés et al., 1988; Maxwell & Phillips, 1990), los cuales colonizan principalmente la región que se encuentra por encima del meristema apical de la raíz, la zona más susceptible a la infección (Bhuvaneswari et al., 1981).

Durante la etapa de reconocimiento y unión del rizobio a la superficie de la raíz la presencia de determinados carbohidratos estructurales de la bacteria es fundamental para tal interacción. En este sentido, los exopolisacáridos (EPS) presentes en la superficie celular de ciertos rizobios desempeñan un rol importante en la etapa de iniciación del desarrollo del nódulo en determinadas leguminosas (Hotter & Scott, 1991). Los glucanos cíclicos $\alpha(1-2)$, otro tipo de polisacárido que se acumula en el espacio periplásmico, participan como mediadores en la unión de estas bacterias a sitios específicos sobre la superficie de las células vegetales de la raíz de las leguminosas (Breedveld & Miller, 1994). Por otra parte, evidencias experimentales demuestran que la presencia de glucanos cíclicos $\alpha(1-2)$ aplicados exógenamente junto con el rizobio, aumentan la nodulación sobre la leguminosa específica (Breedveld & Miller, 1994). Esta propiedad se ha relacionado con la estructura circular que presentan estos polisacáridos de glucosa, que le permite formar complejos de inclusión con determinados flavonoides de la planta que actúan como inductores de genes de la nodulación de rizobios (Morris et al., 1991).

Los flavonoides de la planta, pueden modular la expresión de genes de la bacteria, cuyos productos están implicados en el proceso de formación del nódulo (genes *nod*). Los productos de los genes *nod* son enzimas involucradas en la síntesis de otros carbohidratos, los lipoquitooligosacáridos (LCOs) conocidos como factores Nod. Estos últimos constan de un esqueleto básico formado por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina unidas entre sí por enlaces $\alpha(1-4)$. La cantidad de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina usualmente varía entre 2 y 5. Además, el extremo no reductor del oligosacárido se encuentra unido a una cadena de ácidos grasos. La cantidad de unidades que forman el oligosacárido, en combinación con la presencia de diversos sustituyentes en distintas partes de la molécula, da origen a una gran variedad de factores Nod. Usualmente, cada rizobio produce una familia de factores Nod.

En respuesta a los flavonoides exudados por la leguminosa, los rizobios liberan factores Nod a la rizosfera, y estos últimos provocan una serie de alteraciones en las células de la raíz. Las mismas incluyen la despolarización de la membrana plasmática, cambios en el flujo de calcio y eflujo de protones y re-arreglos en los filamentos de actina del citoesqueleto. Como consecuencia, se producen alteraciones morfológicas consistentes en la deformación y la curvatura de los pelos radiculares, los cuales adquieren la forma de un rulo dentro del cual quedan atrapados los rizobios. Además, los factores Nod inducen la hipertrofia del tejido cortical de la raíz, formándose así el primordio del nódulo (Mylona et

al., 1995). Por otra parte, los factores Nod inducen la expresión de genes de la planta que codifican para proteínas conocidas como nodulinas tempranas. Entre tales proteínas se encuentran las proteínas ricas en prolina ENOD5 (Scheres et al., 1990a) y ENOD12 (Scheres et al., 1990b) una peroxidasa (Cook et al., 1995). Estudios citológicos demuestran que la expresión de estas nodulinas resulta inducida en todas las células epidérmicas cercanas a la región de los pelos radiculares (Cook et al., 1995).

En algunas interacciones leguminosa-rizobio, proteínas presentes en la superficie del pelo radicular, conocidas como lectinas, desempeñan un papel importante en la etapa de iniciación del desarrollo del nódulo. Estas proteínas con capacidad para unir carbohidratos, pueden promover la agregación de los rizobios e inducir la actividad mitótica en células corticales, disminuyendo el umbral de respuesta a los factores Nod (Brewin & Kardailsky, 1997).

1. 1. 2. 3. 1. 2.- Invasión del nódulo

Al mismo tiempo que ocurre la formación del primordio, los rizobios comienzan a infectar la raíz. Si bien la penetración puede ser intra o intercelular, la primera vía es la más común en la interacción entre rizobios y leguminosas. En este caso, en la región del pelo radicular donde previamente se formó el rulo, se produce una hidrólisis local de la pared celular y una invaginación de la membrana plasmática. Luego se produce la síntesis de nuevo material de pared celular de la célula hospedante, dando origen a una estructura tubular conocida como hilo de infección (Gualtieri & Bisseling, 2000). La bacteria entra entonces a la planta a través del interior de dicho hilo, cuya pared es similar a la de la célula vegetal. Dentro del hilo de infección, la bacteria está rodeada por una matriz formada por compuestos de origen vegetal y bacteriano (Mylona et al., 1995). El hilo de infección crece paulatinamente y atraviesa varias capas de células corticales hasta llegar al primordio del nódulo. Luego las bacterias son liberadas al citoplasma de las células que forman parte del primordio del nódulo, por un proceso similar al de endocitosis (Basset et al., 1977). Una vez liberadas al citoplasma de la célula hospedante, las bacterias se diferencian en bacteroides, los cuales son rodeados por una membrana derivada de la membrana plasmática del hospedante, conocida como membrana peribacteroidea. Los bacteroides rodeados de membrana peribacteroidea constituyen los simbiosomas, los cuales posteriormente se dividen y ocupan la mayor parte del citoplasma de las células infectadas.

Los rizobios que utilizan la poco frecuente vía intercelular de infección, penetran la raíz a través de heridas de la epidermis o bien a través de la laminilla media que separa células epidérmicas intactas (Gualtieri & Bisseling, 2000). En ambos casos, la infección continúa por la vía intercelular hasta alcanzar la corteza de la raíz. Vale la pena destacar que en algunas infecciones se combinan las vías de infección intra e intercelulares (Subba-Rao et al., 1995; Tsien et al., 1983;).

Numerosos trabajos han descripto el rol que desempeñan los carbohidratos de superficie celular de los rizobios durante la simbiosis. Estos carbohidratos de superficie incluyen polisacáridos extracelulares (EPS), polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos y glucanos cíclicos (Breedveld & Miller, 1994). Estudios realizados con mutantes de rizobios en la síntesis de EPS, LPS y glucanos cíclicos han revelado la importancia que presentan estos poli y oligosacáridos estructurales en los procesos de infección y en la formación de nódulos efectivos (con capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico) (Battisti et al., 1992; Campbell et al., 2002; Dunlap, et al., 1996; van Workum et al., 1998).

Durante la etapa de infección, la presencia de los rizobios puede inducir en la planta hospedante mecanismos de defensa similares a los que se activan en presencia de microorganismos patógenos. En este sentido, se ha reportado que la infección de la planta por los rizobios puede inducir la acumulación de fitoalexinas (Estabrock & Sengupta-Gopalan, 1991), compuestos fenilpropanoides y enzimas involucradas en su síntesis (Mithöfer, 2002); así como también proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR, Ebel & Mithöfer, 1998) y especies reactivas de oxígeno (Gamas et al., 1998; Santos et al., 2000). De esta manera, se ha asumido que para que se establezca una simbiosis exitosa, los rizobios deben suprimir o evadir las respuestas de defensa del hospedante. En este sentido, tales bacterias han desarrollado la capacidad de sintetizar compuestos que les permiten reconocer y suprimir esos mecanismos de defensa (Mithöfer, 2002). Algunos componentes de la superficie celular de las bacterias, actúan como señales cruciales en la mayoría de las interacciones hospedante-microorganismo (Ebel & Mithöfer, 1998; Gabius, 2000). En particular, el rol de los poli y oligosacáridos de la superficie celular de los rizobios como señales en la supresión de los mecanismos de defensa de la planta es un tema que se ha empezado a estudiar recientemente. Se han obtenido evidencias de que la estructura química de los glucanos cíclicos $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ es importante para tal función en ciertas interacciones leguminosa-rizobio (Bhagwat et al., 1999).

1. 1. 2. 3. 1. 3.- Maduración y senescencia del nódulo

Se considera que el nódulo alcanza la madurez cuando los bacteroides son liberados al citoplasma de la célula hospedante y comienzan a fijar el nitrógeno atmosférico. De este modo, en los nódulos maduros ocurren todos los procesos relacionados con la asimilación del nitrógeno gaseoso con formación de formas reducidas del mismo, las cuales son transferidas a la planta. Los aspectos fisiológicos y bioquímicos de tales procesos serán descritos detalladamente en la sección 1.1.2.3.2.

La última etapa de la ontogenia del nódulo es la de senescencia, en la cual los bacteroides dejan de fijar nitrógeno y el nódulo deja de ser funcional. Esta etapa ha sido menos explorada que las anteriores. La senescencia de los nódulos ocurre en ciertas circunstancias, en leguminosas anuales cuando se produce el llenado de las vainas o bajo condiciones que perturban el ambiente tales como sequía, desfoliación y oscurecimiento (Vikman & Vessey, 1993 a, by c). Existen opiniones contrapuestas en relación con el grado que alcanza la degradación de los bacteroides durante esta etapa de la ontogenia del nódulo. Se ha postulado una hipótesis que afirma que los bacteroides son degradados, y la misma se fundamenta en las siguientes observaciones: 1) inducción de proteasas en nódulos senescentes (Vincent & Brewin, 2000), 2) inducción de isoformas de quitinasas susceptibles a lisozima en nódulos maduros (Xie et al., 1999), 3) correlación entre senescencia del nódulo e incremento en especies reactivas del oxígeno (Evans et al., 1999), 4) presencia de proteínas oxidadas y deterioro de la ultraestructura del nódulo (Matamorros et al., 1999) y 5) tendencia a la lisis de la membrana peribacteroidea y de los bacteroides en nódulos senescentes (Udvardy & Day, 1997). Otros investigadores consideran que los simbiosomas son una forma de compartimiento lisosomal del sistema de endomembranas de la célula hospedante y que este compartimiento puede transformarse en una vesícula lítica si el pH interno se acidifica significativamente, desencadenando la degradación de los bacteroides (Brewin, 1991). En condiciones normales, la excreción de amonio por el bacteroide evita que la entrada continua de ácidos dicarboxílicos y protones acidifique el medio interno del mismo (Brewin, 1991).

Por lo tanto, se puede suponer que la falta de fijación de nitrógeno desencadena una disminución significativa del pH y la consiguiente degradación del bacteroide (Mylona et al., 1995).

Una hipótesis alternativa plantea que los bacteroides pueden escapar a la degradación y sobrevivir durante la última etapa de vida del nódulo (Pfeiffer et al., 1983; Manen et al., 1991; Müller et al., 1994). En este sentido, en un trabajo reciente (Müller et al., 2001), se ha demostrado que el número de bacterias viables, aisladas a partir de nódulos de soja senescentes, no difiere significativamente del número presente en nódulos maduros. En el mismo trabajo, los autores observaron que los niveles de diversos carbohidratos sintetizados por la planta disminuyeron durante la senescencia de los nódulos, mientras que no ocurre lo mismo con los niveles de trealosa, un carbohidrato sintetizado por la bacteria. Por lo tanto, se ha sugerido que la presencia de este disacárido podría proteger al bacteroide de daños en la membrana y/o podría ser utilizado como reserva de energía durante la senescencia del nódulo (Müller et al., 2001). Además, estos resultados sugieren que en esta etapa los bacteroides permanecen biosintéticamente activos mientras ocurre la degradación del tejido vegetal en el nódulo (Müller et al., 2001). De todas maneras, aun no se conocen con precisión los mecanismos que permiten que las bacterias sobrevivan en tales condiciones. En particular, se desconoce si durante etapas del desarrollo del nódulo, anteriores a la senescencia, se produce la acumulación de polímeros no estructurales que podrían servir como reservorio de carbono y energía. Vale la pena destacar que no existe información sobre la regulación del metabolismo del glucógeno en nódulos. Este último es el polisacárido de reserva más importante en bacterias, en las que sirve como fuente de carbono y energía. En forma semejante, existe poca información sobre el metabolismo del polihidroxibutirato en nódulos, polímero que puede actuar como reservorio de carbono y poder reductor.

En la sección 1.1.2.3.3 se describe de manera detallada cómo está integrado el metabolismo de estos polímeros de reserva al metabolismo central del bacteroide.

1. 1. 2. 3. 2.- Tipos de nódulos

Los nódulos que se forman como consecuencia del establecimiento de una simbiosis mutualista entre leguminosas y rizobios, pueden ser de dos tipos: determinados o indeterminados. La formación de uno u otro tipo de nódulo queda establecida por la leguminosa en cuestión y no por el rizobio (Trinick, 1980). De este modo, especies tales como la alfalfa (*Medicago sativa*), el trébol (*Trifolium repens*) y la arveja (*Pisum sativum*) forman nódulos indeterminados, mientras que otras especies como la soja (*Glycine max*), el poroto (*Phaseolus vulgaris*) y *Lotus* spp forman nódulos determinados.

Los nódulos indeterminados se caracterizan por ser cilíndricos, y se originan a partir de la división de las células del córtex interno más cercanas al periciclo. En este tipo de nódulos, un grupo de células del córtex y del periciclo se divide simultáneamente y permanece sin ser infectado por los rizobios, constituyendo el meristema apical persistente que crece hacia la parte más distal de la raíz. Al mismo tiempo, otro grupo de células deja de dividirse y puede ser infectado por rizobios. Debido a la continua actividad del meristema, se van agregando células nuevas al tejido que compone el nódulo (Brewin, 1991), el cual queda formado por distintas zonas. La zona I corresponde al meristema apical. La zona II, o zona de prefijación de nitrógeno, es aquella en la que las células son infectadas por rizobios a través de los hilos de infección. En la interzona II-III, las bacterias comienzan a diferenciarse en bacteroides, mientras que en la zona III

ocurre la fijación de nitrógeno. Finalmente, la zona IV es la región senescente del nódulo. Cada una de las zonas antedichas contiene diferentes tipos celulares que desempeñan funciones específicas, y se extienden desde la parte más distal donde se encuentra el meristema hasta la zona proximal a la raíz (Vasse et al., 1990) (Figura 1).

Por su parte, los nódulos determinados tienen una morfología esférica y se originan a partir de la división de células presentes en las capas más externas del córtex, ubicadas por debajo de la epidermis. En este tipo de nódulos el meristema es transitorio, ya que las células que lo componen cesan su división en estadios tempranos del desarrollo. Parte de esas células son infectadas por rizobios, de modo que el tejido meristemático queda formado por un conjunto de células infectadas y no infectadas (Mathews et al., 1989) (Figura 1).

En ambos tipos de nódulos, el tejido central que contiene células infectadas y no infectadas, queda rodeado por parénquima, en el cual se localizan los haces vasculares. Hacia afuera se encuentran la endodermis y el córtex. Dado que el oxígeno difunde 10^4 veces más rápido en el aire que en una solución acuosa, se ha asumido que el mismo difunde dentro del nódulo a través de los espacios intercelulares. Las células del parénquima constituyen una importante barrera a la difusión del oxígeno, ya que están muy empaquetadas y dejan muy pocos espacios intercelulares (Witty et al., 1986) (Figura 1).

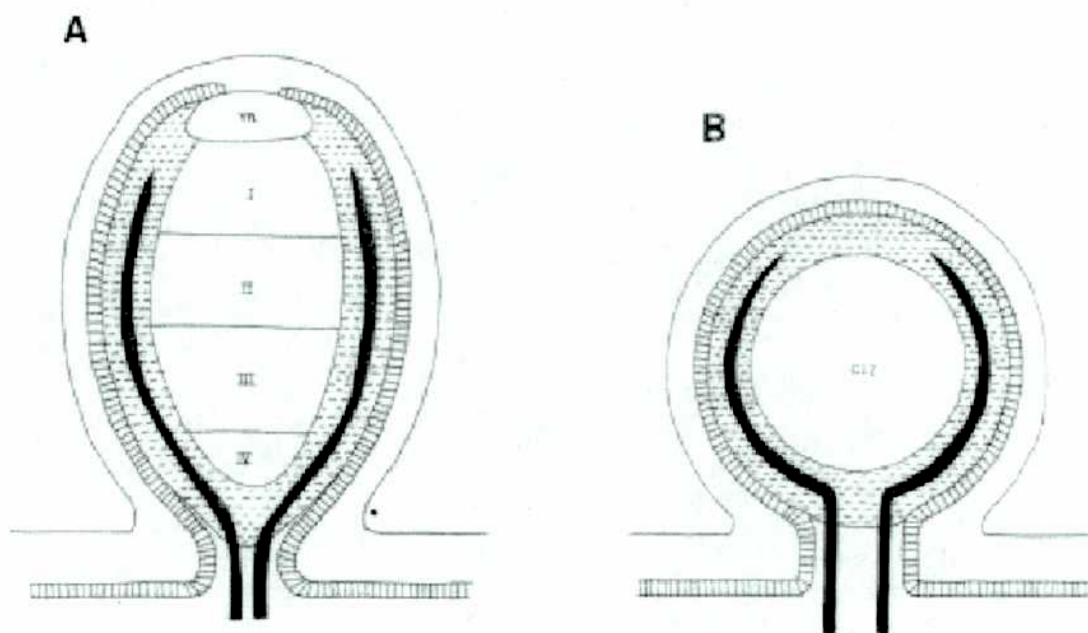


Figura 1.- Tipos de nódulos de leguminosas. A. Nódulo indeterminado. I. Zona de prefijación, donde ocurre la infección, m meristema donde comienza la diferenciación de los rizobios a bacteroides. II interzona donde comienza la fijación de nitrógeno III zona de fijación de nitrógeno. IV zona senescente. **B.** Nódulo determinado. Ciz zona central infectada. Región central del nódulo, formada por células infectadas y no infectadas por bacteroides.

1. 1. 2. 3. 3.- Metabolismo del rizobio y del bacteroide

1. 1. 2. 3. 3. 1.- Utilización de fuentes de carbono

En condiciones de vida libre, los rizobios pueden utilizar diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono, tales como monosacáridos, disacáridos, polialcoholes, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos. Estos microorganismos se pueden dividir en dos grandes grupos, de acuerdo a su velocidad de crecimiento. Los rizobios del género *Bradyrhizobium* son de crecimiento lento mientras que los de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* son de crecimiento rápido (Jarvis et al., 1997; Jordan, 1984;).

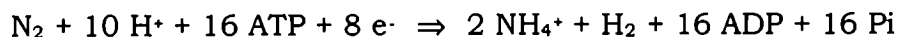
Estudios comparativos de las vías metabólicas que utilizan estos dos grupos de rizobios, determinaron que las cepas de crecimiento rápido oxidan más fácilmente que las de crecimiento lento las pentosas, hexosas, e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), con excepción del citrato. Además, las bacterias de crecimiento lento son incapaces de oxidar disacáridos (Anand & Dogra, 1997). Las vías de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), Entner-Doudoroff (ED) y el ciclo del TCA están presentes en ambos tipos de cepas, mientras que la vía de las pentosas fosfato (VPP) sólo está presente en cepas de crecimiento rápido (Anand & Dogra, 1991).

Además, existen diferencias en los niveles enzimáticos de estas vías metabólicas cuando se comparan ambos tipos de rizobios. En las cepas lentas, los niveles de las enzimas del ciclo del TCA son significativamente más altos que los de las otras vías metabólicas, mientras que en las cepas rápidas se han detectado niveles altos de las enzimas de EMP, PP, y ED y bajos niveles de las enzimas del TCA (Anand & Dogra, 1997).

Por otra parte, en condiciones de simbiosis, los rizobios diferenciados en bacteroides, utilizan los fotosintatos de la planta como fuente de energía y carbono para su metabolismo vital y para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio. La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis que recibe el nódulo (Reibach & Streeter, 1983). Sin embargo, este disacárido, o los productos resultantes de su hidrólisis, no pueden ser metabolizados por los bacteroides, ya que la membrana peribacteroidea es poco permeable a los mono y disacáridos (Poole & Allaway, 2000). La sacarosa, entonces, es metabolizada en el citosol de la célula vegetal, vía la sacarosa sintasa (SS) a ácidos dicarboxílicos (Thummler & Verma, 1987) (malato, citrato, succinato y fumarato), los cuales son transportados activamente a través de la membrana peribacteroidea y constituyen la fuente de carbono y energía primaria para el bacteroide (Poole & Allaway, 2000).

1. 1. 2. 3. 3. 2.- Fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno ocurre dentro de los bacteroides presentes en las células infectadas del nódulo. El complejo nitrogenasa, formado por las hierro-azufre proteínas dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa, es el encargado de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio, el producto primario de la fijación de nitrógeno. La reacción catalizada por el complejo nitrogenasa es la siguiente:



Vale la pena destacar el alto costo energético de la reacción, ya que por cada molécula de nitrógeno reducido se consumen 16 moléculas de ATP.

Dado que la enzima nitrogenasa es irreversiblemente inactivada por las concentraciones de oxígeno presentes en la atmósfera (Brewin, 1991), las células infectadas del nódulo mantienen una concentración de oxígeno menor al 1% respecto a su nivel atmosférico. Las leghemoglobinas conforman un grupo de hemoproteínas que se expresan en el nódulo y que están presentes en altas concentraciones en el citoplasma de células infectadas, donde participan en mantener reducida la concentración intracelular de oxígeno libre. Estas proteínas unen oxígeno con una alta afinidad y lo liberan cuando las concentraciones intracelulares se encuentran por debajo de un cierto nivel crítico. De esta manera, los rizobios reciben una cantidad de oxígeno suficiente para la respiración, mientras se mantienen bajos los niveles de este gas en estado libre dentro del citoplasma de las células infectadas, lo cual evita la inactivación de la nitrogenasa (Appleby, 1984).

El amonio fijado por el bacteroide es exportado a través de la membrana peribacteroidea al citoplasma de la célula infectada, donde es metabolizado a glutamina por la enzima glutamina sintetasa (GS) y luego a ácido glutámico por la enzima glutamato sintetasa (GOGAT). Además, la glutamina puede ser metabolizada a asparagina o a derivados de purina conocidos como ureidos, dependiendo de la leguminosa en cuestión. (Figura 2).

En leguminosas tales como la alfalfa y el trébol, que forman nódulos indeterminados, la asparagina es el principal compuesto nitrogenado que se exporta desde el nódulo a otros órganos de la planta (Vance, 2000). Por su parte, las leguminosas tales como la soja y el poroto, que forman nódulos determinados, sintetizan y exportan ureidos tales como alantoína y ácido alantoico (Schubert, 1986; Atkins & Smith, 2000). También existen evidencias experimentales que demuestran que bacteroides de arveja metabolizan el amonio a alanina para luego exportarla al citosol (Allaway et al, 2000).

1. 1. 2. 3. 3.- Obtención de energía vía el ciclo del TCA

Los rizobios, al igual que otras bacterias aerobias, generan dinucleótidos reducidos a través de la oxidación de distintos compuestos carbonados, que son metabolizados vía el ciclo del TCA. Los dinucleótidos reducidos, son utilizados para generar ATP a través del acoplamiento electroquímico con el sistema de transporte de electrones. El funcionamiento del ciclo del TCA, además de generar poder en forma de NAD(P)H, produce intermediarios para reacciones anabólicas (Dunn, 1998).

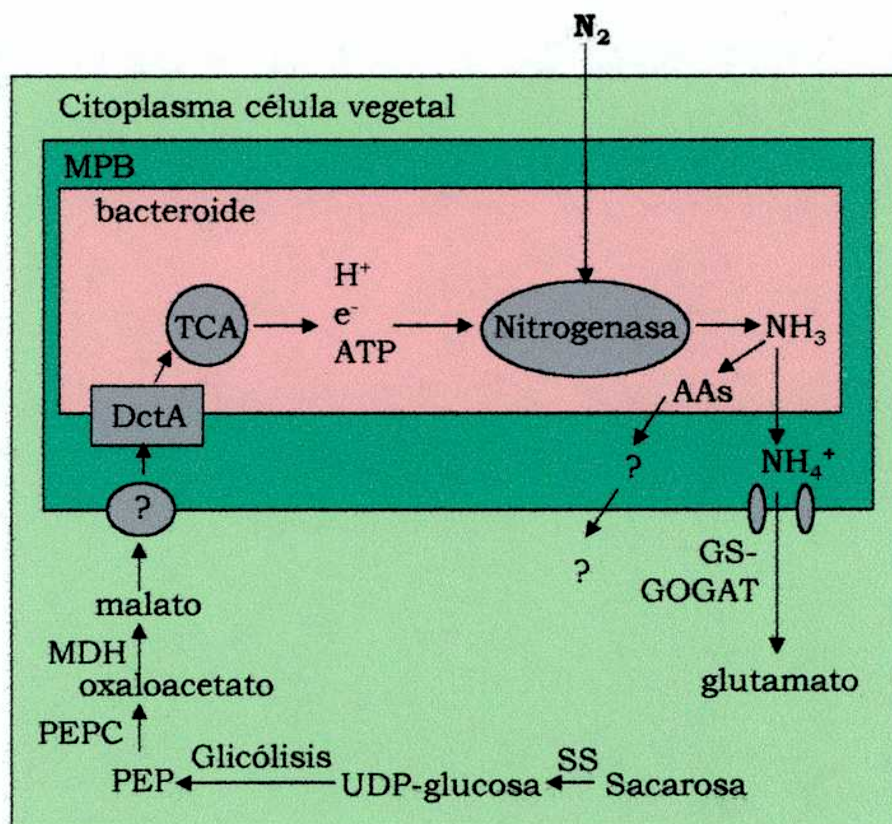


Figura 2.- Intercambio de nutrientes entre la célula vegetal y el bacterioide. AAs, aminoácidos; GS-GOGAT, glutamina sintetasa- Glutamato sintasa; MDH, malato deshidrogenasa; MPB, membrana peribacterioide; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; SS, sacarosa sintasa; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Los bacteroides, de manera similar a los rizobios, necesitan generar energía para sobrevivir dentro del nódulo y para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio a través de la nitrogenasa. A pesar de encontrarse en un ambiente microaeróbico, estos microorganismos producen energía principalmente a través de la oxidación de los ácidos dicarboxílicos vía el ciclo del TCA, que al estar acoplado a la cadena respiratoria, produce altos niveles de ATP. En este sentido, el funcionamiento continuo del ciclo del TCA parece ser crítico para la nitrogenasa y la supervivencia del bacteroide dentro del nódulo. (Dunn, 1998; Lodwig & Poole, 2003).

1. 1. 2. 3. 3. 4.- Regulación del ciclo del TCA

El ciclo del TCA requiere un balance entre la entrada y remoción de compuestos carbonados así como un apropiado equilibrio redox para que funcione de manera óptima. El exceso o defecto de compuestos carbonados y/o coenzimas reducidas puede inhibir el ciclo del TCA. En general, bajo condiciones transitorias de limitación de oxígeno, se ha observado que el transporte de electrones se satura con NADH, disminuye el potencial redox de la célula e incrementa la relación NADH/NAD. La acumulación de coenzimas reducidas inhibe particularmente las enzimas citrato sintasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa y el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH) (Jackson & Dawes, 1976). De manera similar a lo que se observa en otras bacterias, se ha reportado que los rizobios cultivados en medios con limitación de nutrientes esenciales o bajo condiciones microaeróbicas, pueden tener un metabolismo con características “fermentativas”, consistente en una disminución de la tasa de crecimiento y de las actividades de varias enzimas del ciclo del TCA, síntesis y acumulación de PHB, excreción de ácidos orgánicos y aminoácidos (Encarnación et al., 1995). En particular, la acumulación de PHB, consume gran parte del exceso de compuestos carbonados y NAD(P)H que se genera en condiciones microaeróbicas, evitando de esta manera una drástica inhibición de varias enzimas del ciclo del TCA.

Por otra parte, existen evidencias de que este ciclo puede estar inhibido en bacteroides, particularmente a nivel del complejo OGDH, debido a la baja tensión de oxígeno presente dentro del nódulo (Salminen & Streeter, 1987). Algunos indicios sugieren que la regulación del ciclo del TCA en nódulos determinados difiere de aquella de los nódulos indeterminados. En alfalfa, los nódulos indeterminados formados por cepas de *S. meliloti* mutantes en la enzima OGDH son inefectivos; mientras que por el contrario, los nódulos determinados formados en plantas de soja por mutantes semejantes de *B. japonicum*, son efectivos en su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Estos resultados indican que la enzima OGDH es necesaria para el funcionamiento del ciclo de TCA en los nódulos indeterminados mientras que la misma no sería necesaria en nódulos determinados. En estos últimos, probablemente exista al menos una vía alternativa que compensa la ausencia de la enzima OGDH (Lodwig & Poole, 2003).

Para regular el funcionamiento del ciclo del TCA, el bacteroide podría utilizar vías alternativas de sobreflujo, como se observó en los rizobios crecidos en condiciones limitantes de oxígeno (Encarnación et al., 1995). En este sentido, la biosíntesis de polihidroxibutirato (PHB), aminoácidos, ácido γ -amino butírico (GABA) y glucógeno podrían regular dicho ciclo a través de la remoción o generación de intermediarios carbonados, ATP o coenzimas de acuerdo a las condiciones fisiológicas en que se encuentre el bacteroide (Poole & Allaway, 2000). Estas vías metabólicas podrían estar relacionadas entre sí de manera tal

que el bloqueo de alguna de ellas influya directamente sobre el ciclo del TCA o cause un redireccionamiento de intermediarios hacia otra vía. Además, vale la pena destacar que dichas vías biosintéticas pueden competir con la fijación de nitrógeno por el ATP y los electrones.

1. 1. 2. 3. 3. 5.- Polímeros de reserva

Dentro de los productos que se generan en las distintas vías de sobreflujo que podrían estar regulando el ciclo del TCA en rizobios, tanto el PHB como el glucógeno sirven como reservorios de energía y carbono y sus respectivas síntesis ocurren a partir de intermediarios del ciclo (ver Figura 3). Sin embargo la biosíntesis de PHB y su rol en la simbiosis ha recibido mayor atención que la de glucógeno, particularmente en bacterias que establecen nódulos determinados, debido a la gran acumulación de dicho polímero en tales bacterias, tanto en la forma de vida libre como en bacteroides.

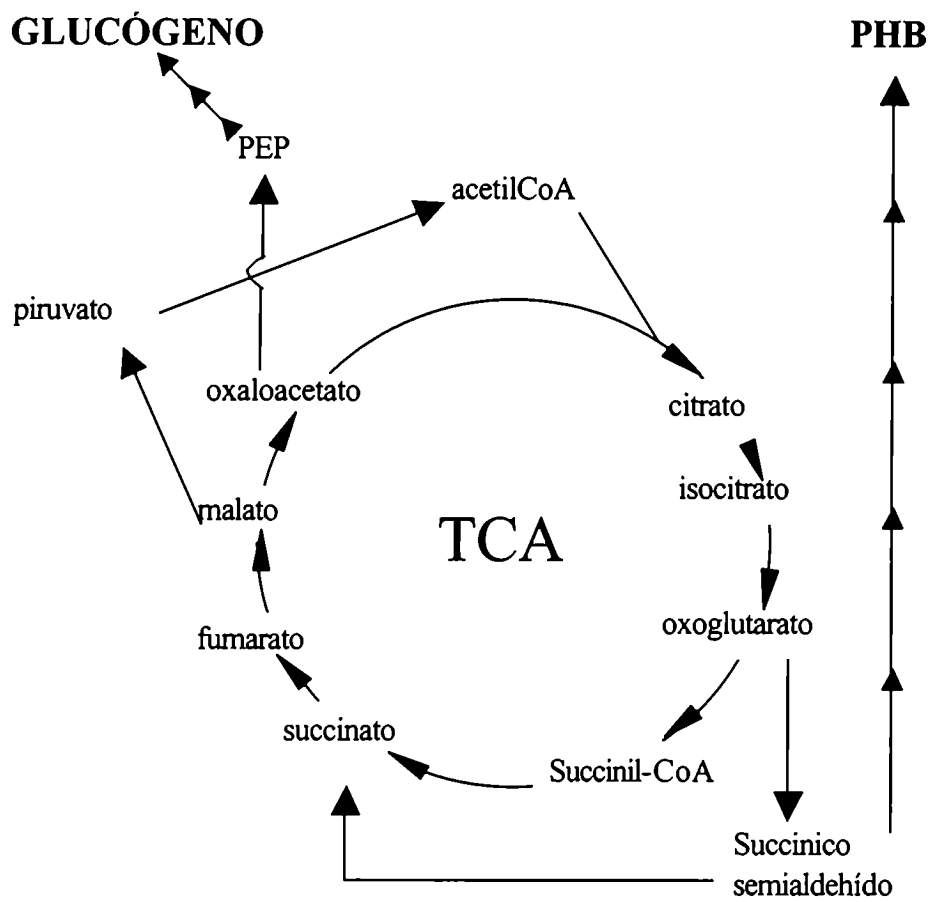


Figura 3.- El ciclo del TCA y la síntesis de polímeros de reserva

1. 1. 2. 3. 3. 5. 1.- PHB

La acumulación de este polímero es variable entre los distintos géneros que agrupan a los rizobios. Las especies que pertenecen a los géneros *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* acumulan grandes cantidades de PHB en condiciones de vida libre (Tombolini & Nuti, 1989; Hirsch et al., 1983). La acumulación de PHB depende de las condiciones de crecimiento y está controlada por la tasa de síntesis y degradación (Stam et al., 1986; Tombolini & Nuti, 1989; Manna et al., 2000). El contenido de PHB dentro de la célula aumenta en condiciones de cultivo donde existe disponibilidad de carbono pero el flujo del mismo hacia la respiración está limitado. En este sentido, se determinó que en condiciones limitantes de oxígeno o a través de sucesivos subcultivos en medio mínimo sin vitaminas, el crecimiento de *R. etli* se reduce significativamente. Además, dichas condiciones de crecimiento resultan en la inhibición de algunas enzimas del ciclo del TCA por ausencia de vitaminas que actúan como cofactores de las mismas, y esto resulta en un incremento de la acumulación de PHB (Encarnación et al., 1995).

Se ha demostrado que la presencia de PHB en bacteroides depende del tipo de nódulo que forme la leguminosa en cuestión. En ese sentido, los bacteroides presentes en nódulos determinados tales como los de *B. japonicum*, *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, acumulan gran cantidad de PHB, alcanzando niveles de hasta el 70% del peso seco del bacteroide. Por el contrario, no se ha reportado la presencia de este polímero en bacteroides de nódulos indeterminados (Lodwig & Poole, 2003).

El análisis ultraestructural de nódulos determinados de poroto infectados con *R. etli* mostró ausencia de PHB en las bacterias presentes en el hilo de infección. El mismo estudio confirmó que dicho polímero aparece en estadios posteriores, en bacteroides jóvenes y maduros, en los cuales se acumula de manera considerable (Cermola et al., 2000). Por otra parte, no se ha encontrado PHB en nódulos colonizados por mutantes de *R. etli* que no fijan nitrógeno, sugiriendo que la síntesis de este polímero dentro del bacteroide requiere de la fijación de nitrógeno (Cermola et al., 2000). Se ha determinado que durante el desarrollo de nódulos el contenido de PHB y la actividad de las enzimas que intervienen en su síntesis, aumentan en los bacteroides de *B. japonicum*. Sobre la base de estas evidencias experimentales y dada la importancia que tiene el ciclo del TCA para el metabolismo del bacteroide, se postuló que la acumulación de PHB en los bacteroides tendría un rol regulatorio en el metabolismo del ciclo del TCA, tal como se mencionó para los rizobios de vida libre. En este sentido, la síntesis del polímero consumiría el exceso de compuestos carbonados y poder reductor y produciría un balance en la cantidad de carbono metabolizado por el ciclo del TCA, evitando que las condiciones microaeróbicas del bacteroide, inhiban algunas enzimas del mismo (McDemott et al., 1989). Según esta hipótesis, la inhibición de la síntesis de PHB en los bacteroides podría tener efectos negativos sobre la simbiosis. Sin embargo, los resultados obtenidos con una mutante de *R. etli* incapaz de sintetizar PHB demostraron que esto no ocurre y, contrariamente a lo esperado, los nódulos formados por dicha mutante fijan nitrógeno durante más tiempo que aquellos formados por una cepa salvaje (Cevallos et al., 1996). Estos datos sugieren que el metabolismo del PHB es independiente de la fijación de nitrógeno y que compete u opera a expensas de la nitrogenasa por los sustratos: ATP y poder reductor (Lodwig & Poole, 2003).

Los rizobios de nódulos indeterminados tales como *S. meliloti*, *M. ciceri* y *R. leguminosarum* bv. *viciae*, acumulan PHB en vida libre pero no en bacteroides a pesar de que las actividades de las enzimas que participan en la síntesis y degradación son similares en ambos estadios (Tombolini & Nuti, 1989; Lee &

Copeland, 1994; Lodwig & Poole, 2003). El análisis ultraestructural de los nódulos indeterminados indica que hay acumulación de PHB dentro de las bacterias que se encuentran en los hilos de infección, pero este polímero no se detecta cuando las bacterias son liberadas al citoplasma de la célula hospedante, transformadas en bacteroides y también está ausente en bacteroides de nódulos maduros (Lodwig & Poole, 2003). Mutantes de *S. meliloti* en genes que codifican para enzimas de la síntesis o degradación de PHB no modifican su capacidad de fijar nitrógeno dentro del nódulo respecto a la cepa salvaje (Lodwig & Poole, 2003).

1. 1. 2. 3. 3. 5. 2.- Glucógeno

El glucógeno es un polisacárido (ver también sección 2) formado por una cadena de glucosas unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ y ramificaciones cada 8 a 12 residuos, a través de enlaces $\alpha(1-6)$ (Figura 4). Este polímero se acumula como reservorio de carbono y energía en la mayoría de las bacterias y habiéndose reportado su presencia en más de 40 especies de bacterias, pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos (Preiss, 1984; Ballicora et al, 2003). Sin embargo, la información sobre la presencia del mismo en rizobios es escasa, y sólo ha sido reportada en especies que forman nódulos en trébol (*Trifolium repens*) y en *Lotus* spp. (Dixon, 1967; Craig & Williamson, 1972).

Generalmente, las bacterias acumulan glucógeno bajo condiciones de exceso de carbono en el medio y limitación del crecimiento por la ausencia de algún nutriente esencial. La mayoría de las especies acumulan este polisacárido durante la fase estacionaria cuando cesa el crecimiento por la ausencia de nitrógeno (Holme & Palmstierna, 1956; Sigal et al., 1964; Strange et al., 1961; Mudler et al., 1962; Madsen, 1963; Zevenhuizen, 1966), disminución del pH (Zevenhuizen, 1966), deficiencia de fósforo (Zevenhuizen, 1966) y deficiencia de sulfato (Zevenhuizen, 1966). Si bien la acumulación de glucógeno depende de las condiciones nutricionales del medio y de la fase de crecimiento, dicho polímero puede representar hasta el 50% del peso seco de la célula en condiciones favorables para su almacenamiento (Preiss, 1984; Preiss & Romeo, 1989; Ballicora et al, 2003).

Aunque la información referente a los factores que determinan la acumulación de glucógeno en rizobios de vida libre y en bacteroides es escasa, se ha reportado la presencia de altas concentraciones de este polisacárido en cultivos de *B. japonicum*, *R. leguminosarum* y *S. meliloti* bajo condiciones limitantes de nitrógeno, tal como ocurre en bacterias no relacionadas (Tsien & Schmidt, 1977; Zevenhuizen, 1981; Povolito et al., 1994). En estos estudios también se determinó que la síntesis de glucógeno y PHB ocurren en forma simultánea. En este sentido, el rol del glucógeno podría ser similar al reportado para el PHB, como regulador del exceso de carbono y poder reductor, evitando la inhibición de enzimas del ciclo del TCA. De este modo, el bacteroide podría continuar metabolizando los compuestos carbonados que recibe de la planta. Por otra parte, la mutante *phaC* de *R. etli*, incapaz de sintetizar PHB, acumula mayor cantidad de glucógeno que la cepa salvaje (Cevallos et al., 1996). Esto sugiere que el flujo de carbono entre ambos polímeros de reserva es relativamente plástico (Lodwig & Poole, 2003).

Estudios realizados en *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Streptococcus mitis*, en los cuales se comparó la viabilidad de cepas que no acumulan glucógeno con la de cepas tipo salvaje, determinaron que la presencia del polisacárido prolonga la tasa de supervivencia de las bacterias (Ballicora et al, 2003). Por otra parte, algunos estudios aportan fuertes evidencias de que el glucógeno actúa como compuesto de reserva de carbono y energía. En uno de estos estudios, se

comprobó que la acumulación de glucógeno impide la degradación de ARN y proteínas cuando las células se encuentran en condiciones limitantes de nutrientes, indicando que el glucógeno aporta carbono y energía para la supervivencia de las células bajo condiciones de estrés. Otro estudio realizado en bacterias formadoras de esporas, determinó que el polisacárido se acumula previo a la esporulación y luego de la misma, es rápidamente degradado (Iglesias & Preiss, 1992).

Aunque se han realizado numerosos estudios sobre el metabolismo del glucógeno en bacterias, es escasa la información referente a los rizobios en particular. Por ese motivo, se desconoce el rol que desempeña este polisacárido durante la simbiosis mutualista leguminosa-rizobio. Sin embargo, dado que la síntesis del mismo consume carbono y energía en la forma de ATP, es probable que dentro del nódulo, dicha vía compita con la nitrogenasa por el sustrato ATP, tal como se sugirió para el PHB (sección 1.1.2.3.3.5.1, Lodwig & Poole, 2003).

Recientemente, se han publicado dos trabajos realizados con mutantes *glgA* (glucógeno sintasa) de *R. tropici* (Marroquí et al., 2001) y *M. loti* (Lepek et al., 2002), incapaces de producir glucógeno. Si bien los resultados de ambos trabajos son contradictorios entre sí en relación con la eficiencia simbiótica de las mutantes, vale la pena destacar que en ambos casos se sugirió que la síntesis del mismo no es necesaria para el establecimiento de la simbiosis. Uno de ellos sugirió que la síntesis de glucógeno podría disminuir la eficiencia simbiótica de *R. tropici* y el otro indicó que la ausencia o presencia de dicho polisacárido no tiene ningún efecto sobre la nodulación de *M. loti*. Sin embargo, los resultados obtenidos con la mutante *phaC* de *R. etli*, incapaz de sintetizar PHB, contradicen estas evidencias (Cevallos et al., 1996). En este trabajo se sugirió que la síntesis de glucógeno no compite con la nitrogenasa, ya que dichas mutantes producen altas concentraciones de glucógeno y los nódulos formados por las mismas fijan nitrógeno durante más tiempo que los formados por la cepa salvaje. Sin embargo, no está claro si los niveles de glucógeno detectados en cultivos de la bacteria aislada son representativos de los presentes en el nódulo, ya que no se determinó la concentración de dicho polímero en estos últimos (Cevallos et al., 1996). A pesar de la información obtenida en los trabajos antes mencionados, aún no se conoce con certeza el rol del glucógeno (si lo tiene) dentro del nódulo.

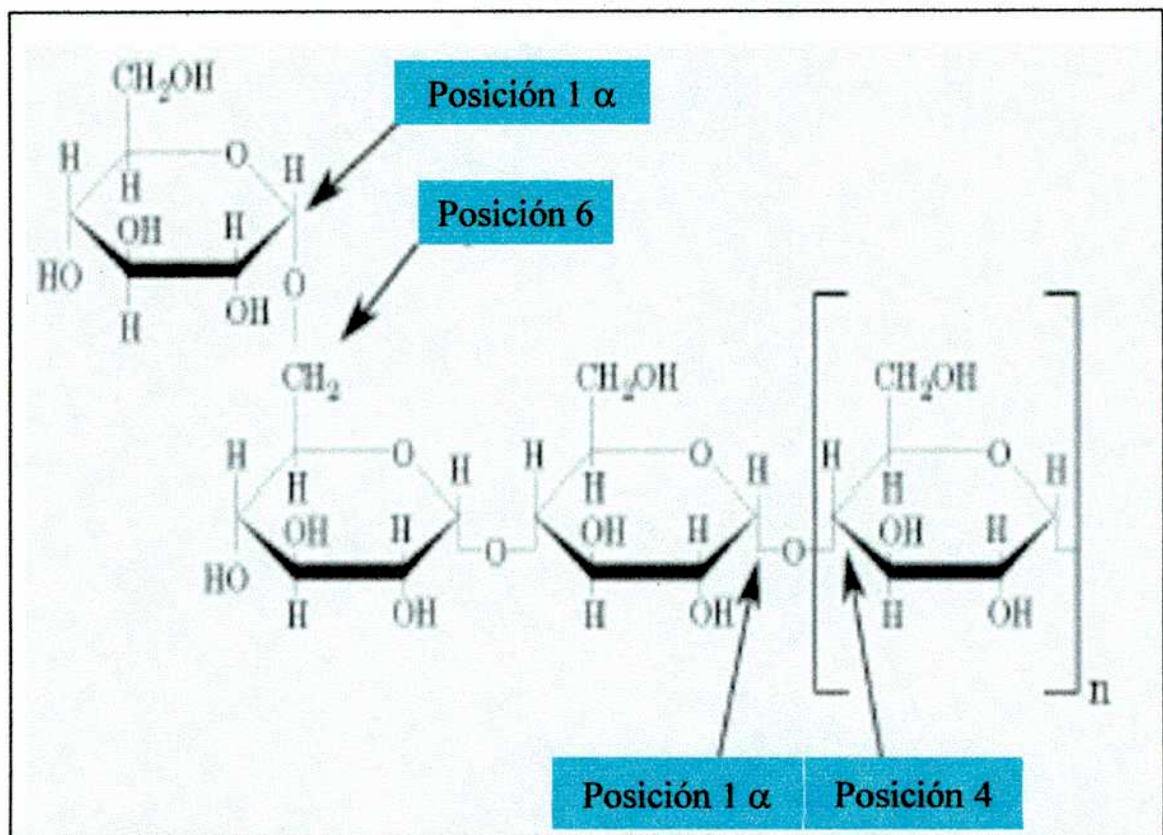


Figura 4. Esquema de la molécula de glucógeno. Se muestra el enlace $\alpha(1,4)$ entre residuos de glucosa, que forman la cadena lineal y el enlace $\alpha(1,6)$ entre residuos de glucosa, en el sitio de la ramificación de la cadena.

1. 1. 2. 3. 4.-- La simbiosis mutualista *Lotus* spp- rizobio

Las especies que conforman el género *Lotus* establecen simbiosis con cepas denominadas originariamente como *Rhizobium loti* y que posteriormente se agruparon en los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Jarvis et al., 1982 ; Jordan, 1982 ; Jordan, 1984). Dentro del primer género se encuentran cepas de crecimiento rápido mientras que las cepas agrupadas en el género *Bradyrhizobium* son de crecimiento lento. En esta simbiosis, se ha establecido una relación entre la tasa de crecimiento de las distintas cepas de rizobios y la capacidad de nodular determinada especie de *Lotus* (Tabla 2). Las cepas de crecimiento rápido forman nódulos efectivos en *L. glaber* (ex *L. tenuis*), *L. corniculatus* y nódulos inefectivos en otras especies como *L. pedunculatus*, *L. subbiflorus* (Pankhurst et al., 1987; Monza et al., 1992). Por el contrario, las cepas de crecimiento lento son incapaces de formar nódulos en *L. glaber*, y forman nódulos efectivos en *L. pedunculatus* y en otras especies del género *Lotus* (Wood et al., 1985; Irisarri et al., 1996; Pankhurst et al., 1979) (Tabla 2). Además, se han descrito algunas cepas de crecimiento rápido con un amplio rango de hospedante que pueden formar nódulos efectivos en las distintas especies de *Lotus* y en otras leguminosas (Pankhurst, 1977; Pankhurst et al., 1987) (Tabla 2).

Numerosos estudios sugieren que los rizobios de crecimiento lento son más efectivos en su capacidad de fijar nitrógeno comparado con los rizobios de crecimiento rápido. Estudios morfométricos realizados en *L. pedunculatus* con la cepa de crecimiento rápido de amplio rango de hospedante NZP 2037 y la cepa lenta NZP 2309, determinaron que la primera forma nódulos más grandes que esta última. Sin embargo, los nódulos de la cepa lenta tienen mayor actividad de nitrogenasa y tienen una mayor proporción de células infectadas con bacteriodes que los nódulos formados por la cepa rápida (Wood et al., 1985). Estas diferencias en la efectividad de los nódulos también se reportaron en otras interacciones leguminosa-rizobio, en las cuales dichas leguminosas son noduladas por cepas de crecimiento rápido y lento. Las plantas de soja comercial (*Glycine max* L. Merr.) forman nódulos efectivos con la especie de crecimiento lento *B. japonicum* y nódulos con menor capacidad de fijar nitrógeno con cepas de *S. fredii*, de crecimiento rápido (Keyser et al., 1982).

Por otra parte, la leguminosa *Cajanus cajan* también es nodulada por especies de crecimiento rápido y lento. En esta interacción los nódulos colonizados por las cepas lentas también tienen mayor eficiencia en la capacidad de fijar nitrógeno que los formados por cepas rápidas. Estudios metabólicos entre ambos tipos de rizobios determinaron que las cepas rápidas tienen una mayor capacidad oxidativa de los sustratos carbonados que las cepas lentas. Estos resultados, sumados a una mayor actividad de las enzimas del ciclo del TCA en estas últimas sugieren que son más eficientes en generar mayor cantidad de poder reductor y ATP que puede dirigirse hacia una mayor fijación de nitrógeno comparado con las cepas rápidas (Anand & Dogra, 1997).

1. 1. 2. 3. 4. 1.- Las especies de *Lotus* y su importancia agronómica

El género *Lotus* comprende más de 200 especies (anuales, bianuales, perennes), de origen europeo y americano (Allen & Allen, 1981; Kirkbride, 1999), presenta una gran adaptabilidad y variabilidad entre las distintas especies e incluye poblaciones de porte muy diverso (rastrero, semi-erecto, erecto, sub-arbustivo, etc.). Esto posibilita distintas formas de utilización en la alimentación del ganado (ovino - bovino), sea bajo pastoreo directo o mediante la confección de

reservas (heno, silo, henolaje) según la estrategia de producción (Montes, 1988). Las especies del género *Lotus* en general, combinan características de calidad forrajera similar a la alfalfa pero con la ventaja de no provocar meteorismo (asociado a su tenor de taninos) y de adaptarse a suelos donde aquella no prospera (Montes, 1988; Langer, 1990). Las áreas de producción de especies de *Lotus* de importancia forrajera, se ubican principalmente en las zonas norte-central de Estados Unidos, central y occidental de Canadá, Nueva Zelanda, central de Europa y parte sur de Sudamérica (Brasil, Uruguay y Argentina) (Fairey & Smith, 1999).

Las especies de *Lotus* son utilizadas frecuentemente para aumentar la calidad y producción de las pasturas naturales en las cuales predominan gramíneas de baja calidad. Las especies agrónomicamente más utilizadas son *L. corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* (Acuña, 1998). Sin embargo, en los suelos con problemas de drenaje y pH alcalino también se utiliza *L. glaber* (Miñón et al., 1990) y en suelos con elevada acidez, excesiva humedad y/o bajos niveles de fósforo se utiliza *L. pedunculatus* (Acuña, 1998).

En la República Argentina, distintas especies como *L. corniculatus* L., *L. glaber* Mill., *L. pedunculatus* Cav. and *L. suaveolens* Pers., se han naturalizado (Burkart, 1952; Montes, 1982; Burkart et al. 1987; Arambarri, 1997). Sin embargo, la especie más adaptada en nuestro país es *L. glaber* Mill, la cual se ha naturalizado en una extensa región denominada Pampa Deprimida del Salado que comprende aproximadamente 9 millones de hectáreas de la provincia de Buenos Aires y es la zona de cría vacuna más importante del país, con pastizales naturales que constituyen el principal recurso forrajero. Los suelos de esta región se caracterizan por ser de baja fertilidad y heterogéneos, particularmente en términos de los niveles de salinidad y pH (León et al., 1975). Una parte de los mismos son bajos salino-alcalinos expuestos frecuentemente a períodos de anegamiento invernal aunque también se encuentran regiones con suelos ácidos y baja fertilidad. Por otro lado, las sequías estivales también ocurren con frecuencia en esta región. Las características edafo-climáticas antedichas, limitan severamente la adaptación de especies vegetales de alto valor forrajero en general, y de leguminosas en particular. *Lotus glaber* es una leguminosa originaria de la región del Mediterráneo, detectada por primera vez en la Pampa Deprimida del Salado alrededor de 1930. Desde entonces, la superficie ocupada por dicha especie aumentó considerablemente ya sea por resiembra natural o por siembra inducida, particularmente en los suelos alcalinos y salinos (Montes, 1988, Miñón et al., 1990).

Teniendo en cuenta lo antedicho, resulta evidente que la utilización adecuada de las distintas especies del género *Lotus* para cada tipo de suelo, es una de las opciones más factibles para mejorar la calidad y la producción de las pasturas en la Pampa Deprimida.

Sin embargo, uno de los factores que determinan la calidad y producción de las leguminosas, es la capacidad de establecer simbiosis mutualistas con rizobios. En esta área aún queda mucho por estudiar dado que existe, como hemos mencionado en la sección anterior, una alta especificidad entre las distintas especies de *Lotus* y los rizobios que las nodulan. Esta especificidad genera frecuentemente una incompatibilidad para el establecimiento de una simbiosis efectiva, entre los distintos rizobios que se utilizan como inoculantes y las especies de *Lotus* que se cultivan para el forraje.

1. 1. 2. 3. 4. 2.- El rol de los flavolanos de especies de *Lotus* en el establecimiento de la simbiosis con rizobios.

Los flavolanos también denominados taninos condensados (Goldsterin & Swain, 1963) o proantocianidinas (Haslam, 1975), incluyen entre otros a un gran número de polímeros de catequinas, denominados procianidina, o de galocatequinas, denominado prodelfinidina. Este grupo de metabolitos secundarios de las plantas puede interactuar con enzimas y proteínas en general y con ciertos polisacáridos (Kefeli & Kutacek, 1977; Jones & Mangan, 1977) El tipo de interacciones que establecen pueden ocasionar efectos tales como una inhibición de la actividad enzimática, evitando la degradación de proteínas por parte de microorganismos (Handley, 1961), puede afectar el crecimiento de las plantas interactuando con hormonas (Corcoran et al., 1972) e inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Swain, 1977; Henis et al., 1964) incluyendo a los rizobios (Pankhurst & Jones, 1979).

Se ha descripto que las distintas especies del género *Lotus* presentan diferencias cuali y cuantitativas de flavolanos en raíces y hojas y que dichas diferencias pueden influir en la nodulación de estas leguminosas con rizobios (Tabla 2). La sensibilidad *in vitro* que presentan ciertas cepas de rizobios a los flavolanos de determinadas especies de *Lotus*, en particular a los enriquecidos en prodelfinidina, parece estar relacionada con su habilidad para formar nódulos efectivos en dichas especies. En este sentido, se ha observado que la cepa de crecimiento rápido NZP 2037 que forma nódulos efectivos en *L. pedunculatus* (Figura 5), es más resistente a los flavolanos presentes en dichas raíces que la cepa NZP 2213, la cual forma nódulos inefectivos en esta leguminosa (Figura 5, Tabla 2) (Pankhurst & Jones, 1979). La cepa NZP 2037 mostró una mayor capacidad de unión a los flavolanos de *L. pedunculatus* que la cepa NZP 2213. Un estudio posterior sugirió que la capacidad de unión a dichos flavolanos se debe a la presencia de determinados polisacáridos de pared en la cepa NZP 2037. Además, se sugirió que las diferencias que presentan las cepas NZP 2037 y NZP 2213 en la capacidad de nodular *L. pedunculatus* están relacionadas con diferencias en los polisacáridos de pared que unen flavolanos (Jones et al., 1987).

Si bien se han realizado estudios para identificar dichos polisacáridos, aún no se ha establecido que tipo de molécula está involucrada en la interacción con flavolanos (Jones et al., 1987). Por otra parte, aún no se han realizado estudios para caracterizar polisacáridos de pared que pudieran interaccionar con flavonoides, en cepas de crecimiento lento que nodulan especies de *Lotus* con un alto contenido de flavolanos. Estos estudios serían particularmente interesantes dado que las cepas de crecimiento lento tienen un rango de hospedante diferente y opuesto al de la cepa NZP 2213 (Tabla 2), tal como se mencionó en la sección anterior. Respecto a las diferencias que pueden existir en los polisacáridos de pared de rizobios que presentan distinta velocidad de crecimiento, es importante destacar que se ha establecido una relación entre la velocidad de crecimiento de los rizobios y el tipo de glucano cíclico que producen. Los glucanos cíclicos son polisacáridos que encuentran asociados a la pared de estas bacterias y cumplen roles importantes en la simbiosis con leguminosas. En la sección 2. 1 se mencionará de manera más detallada la síntesis y estructura de los mismos así como la función que se le ha asignado a estos polisacáridos en la simbiosis.

Tabla 2. Contenido de flavolanos en especies de *Lotus* que establecen simbiosis con rizobios de crecimiento rápido y lento.

Especie	Concentración de flavolanos en raíces noduladas		Fenotipo de los nódulos		
	Total (mg/gpf)	Relación Dp: Cy: otros	NZP 2037	NZP 2213	NZP 2309
<i>L. angustissimus</i>	2,95	70:30:otros	Nod+ Fix+	Nod+ Fix-	Nod+ Fix+
<i>L. pedunculatus</i>	3,5	75:25:0	Nod+ Fix+	Nod+ Fix-	Nod+ Fix+
<i>L. subbiflorus</i>	2,5	61:38:1	Nod+ Fix+	Nod+ Fix-	Nod+ Fix+
<i>L. corniculatus</i> var <i>hirsutus</i>	2,16	50:50:0	Nod+ Fix+	Nod+ Fix-	Nod+ Fix+
<i>L. corniculatus</i> var <i>cree</i>	3,75	0:95:0	Nod+ Fix+	Nod+ Fix-	Nod- Fix-
<i>L. glaber</i>	2,78	0:95:5	Nod+ Fix+	Nod+ Fix-	Nod- Fix-
<i>L. japonicus</i>	2,97	0:90:10	Nod+ Fix+	Nod+ Fix-	Nd

Los datos fueron obtenidos de la siguiente bibliografía: Pankhurst & Jones, 1979; Pankhurst et al., 1987; Irisarri et al., 1996; Pankhurst et al., 1986; Monza et al., 1992. Mg/gpf, miligramos/gramo de peso fresco de raíz; Dp, delfinidina; Cy, cianidina, otros: antocianinas no identificadas; Nod+ Fix+: nódulos fijadores de nitrógeno; Nod+ Fix-, nódulos incapaces de fijar nitrógeno; Nd, no determinado; NZP 2213; cepa de crecimiento rápido con estrecho rango de hospedante; NZP 2037, cepa de crecimiento rápido con amplio rango de hospedante; NZP 2309, cepa de crecimiento lento con estrecho rango de hospedante.

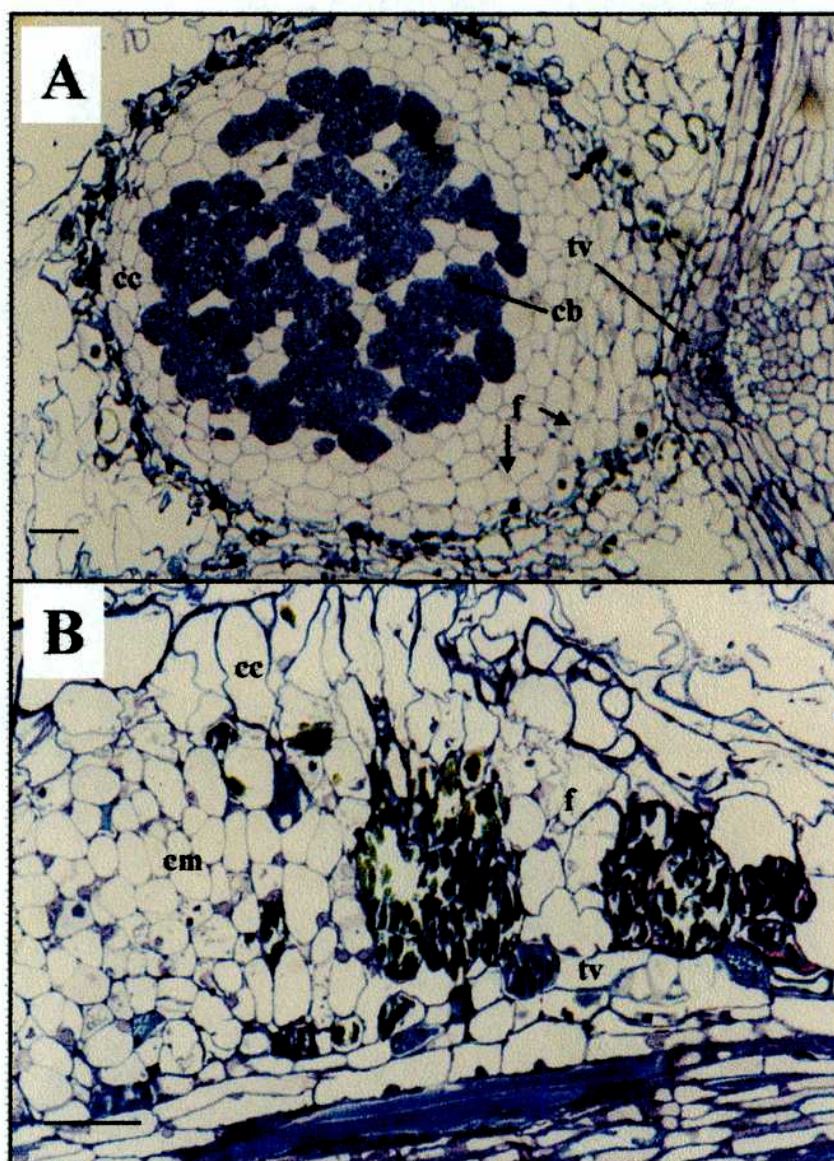


Figura 5.- Corte transversal de nódulos formados en *Lotus pedunculatus*. **A**, nódulo efectivo formado por la cepa NZP 2037. **B**, nódulo inefectivo formado por la cepa NZP 2213. **f**, flavolanos; **cc**, células del córtex externo; **em**, células meristemáticas; **tv**, tejido vascular; **cb**, células infectadas con bacteroides. Barra, 50 μ m

2.- POLISACÁRIDOS BACTERIANOS

Las bacterias sintetizan una gran diversidad de polisacáridos, los cuales cumplen funciones importantes en el metabolismo de las mismas y en su interacción con otras células. Los polisacáridos son un grupo de carbohidratos formado por cadenas de decenas o miles de monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos. Pueden ser lineales o estar ramificados. Estos carbohidratos se diferencian de acuerdo al tipo de monómero que los forman, a la longitud y al grado de ramificación de sus cadenas y al tipo de unión entre sus monómeros.

Los homopolisacáridos son polisacáridos formados por un solo tipo de monómero. Dentro de este grupo se encuentra el glucógeno, formado por unidades de glucosa con enlaces tipo α , el cual se almacena dentro de las bacterias y actúa como reservorio de energía y carbono. Los α -glucanos son también homopolisacáridos formados por cadenas de glucosa unidas por enlaces α entre distintos carbonos de la hexosa. Este tipo de glucanos es acumulado en el espacio periplásmico ubicado entre la membrana plasmática y la membrana externa de bacterias Gram negativas del grupo de Proteobacterias (Bohin, 2000). Estos glucanos pueden ser lineales o cíclicos y su concentración está regulada por las condiciones osmóticas del medio (Bohin, 2000). Estos polisacáridos se han agrupado en 4 familias de acuerdo a la estructura que presentan en las distintas especies de las subdivisiones alfa, beta y gama de las Proteobacterias (Figura 6). Los glucanos de la familia I son lineales, con un grado de polimerización (DP) variable entre 5 y 12 residuos de glucosa (Figura 6). La estructura de estos polisacáridos está formada por una cadena de glucosas unidas por enlaces α (1,2) y presenta ramificaciones que se unen a la cadena principal por enlaces α (1,6) (Figura 6). Estas estructuras se encuentran en especies de la subdivisión gama de Proteobacterias que incluyen *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi* y *Pseudomonas syringae* (Figura 6). Los glucanos de la familia II se encuentran en bacterias de las especies *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* y *Brucella*. (Breedveld & Miller, 1994; Bohin, 2000). Estos compuestos están formados generalmente por enlaces α (1,2), son cíclicos y tienen un DP variable entre 17 y 25 residuos de glucosa (Breedveld & Miller, 1994). Los glucanos de la familia III están formados por especies cíclicas que tienen principalmente enlaces α (1,3) y α (1,6). Las especies de *Bradyrhizobium* analizadas presentan glucanos cíclicos α (1,3), α (1,6) que contienen entre 10 y 13 residuos de glucosa por anillo. (Rolin et al., 1992) (Figura 6). Las especies de *Azospirillum* presentan glucanos con tres estructuras químicas diferentes. La estructura 1 está formada por 12 residuos de glucosa con 3 tipos de enlaces diferentes: 3 enlaces α (1,3), 8 enlaces α (1,6) y uno α (1,4) (Figura 6). La estructura 2 está formada por la estructura 1 con el agregado de un residuo α (1,3) y la estructura 3 es similar a la estructura 2 pero con el agregado de un grupo 2-O-metilo sobre un residuo de glucosa unido por un enlace α (Figura 6) (Altabe et al., 1998). Por último, la familia IV está formada por glucanos cíclicos formados principalmente por enlaces α (1,2) y un enlace α (1,6) que se han reportado en las especies *Ralstonia solanacearum*, *Xantomonas campestris* y *Rhodobacter sphaeroides* (Bohin, 2000; Lippens et al., 1998) (Figura 6).

El grupo de los heteropolisacáridos está representado por el compuesto mayoritario de la pared bacteriana, el peptidoglicano, el cual es una cadena alternada de unidades de N-acetil glucosamina y N-acetil neuramínico. Las cadenas lineales de cada peptidoglicano están unidas a una cadena peptídica corta, cuya composición aminoacídica varía en distintas especies bacterianas. Esta estructura otorga rigidez a la pared de las células bacterianas y ayuda a mantener la integridad de las mismas (Lehninger et al., 1993). También se encuentran los polisacáridos extracelulares formados por microfibras de

celulosa, polisacáridos capsulares (CPS) y polisacáridos extracelulares aniónicos (EPS) y los lipopolisacáridos (LPS) que se localizan en la superficie extracelular de los rizobios (Spaink, 2000) cuya estructura y función se mencionará más adelante.

Generalmente, la estructura tridimensional y las funciones desempeñadas por los polisacáridos, están relacionadas con la configuración (α o β) del carbono anomérico (carbono 1) que participa en los enlaces glicosídicos entre los monosacáridos que lo componen.. En este sentido, los polisacáridos con uniones tipo α como el glucógeno adoptan una estructura helicoidal compacta y son reservorios de energía para la célula. En cambio, algunos polisacáridos lineales con uniones tipo β como el peptidoglicano y las microfibras de celulosa, tienen una estructura extendida que les permite formar estructuras que otorgan rigidez a la pared celular (Lehninger et al., 1993; Matthyse, 1983).

2. 1.- POLISACÁRIDOS BACTERIANOS QUE PARTICIPAN EN LA SIMBIOSIS MUTUALISTA LEGUMINOSA-RIZOBIO

Los rizobios sintetizan y acumulan diferentes polisacáridos de tipo α y β , los cuales cumplen funciones relevantes en su adaptación a los distintos entornos ambientales, ya sea en vida libre o en simbiosis. En particular, numerosos estudios sobre los factores Nod, EPS, LPS, β -glucanos cíclicos y en menor medida sobre el glucógeno, han comprobado que estos compuestos son importantes para el establecimiento de una simbiosis exitosa entre los rizobios y las leguminosas. En las secciones siguientes se describe la estructura y la función de los polisacáridos antedichos, a excepción de los factores Nod, sobre los que se ha hecho referencia en la sección 1.1.2.3.1.1. dedicada a la iniciación del nódulo y del glucógeno, al cual se ha hecho referencia en la sección 1.1.2.3.3.5.2, dedicada a los polímeros de reserva del bacteroide.

2. 1. 1.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

2. 1. 1. 1.- EPS

En rizobios, al igual que en muchas otras proteobacterias, los EPS son heteropolímeros formados por unidades repetitivas compuestas por determinadas combinaciones de D-glucosa, D-manosa, L-ramnosa y ácidos D-glucurónico y D-galacturónico, unidas por enlaces tipo β y algunos enlaces tipo α . Las unidades repetitivas son altamente variables entre las distintas especies de rizobios. En algunos casos, los monosacáridos están modificados por grupos acetilos, piruvilos, succinilos e hidroxibutanoilos. Además, un mismo rizobio puede sintetizar diferentes clases de EPS, ya sea con la misma o con diferentes unidades repetitivas.

Estos polímeros se localizan en la superficie extracelular de la bacteria y su masa molecular es variable, ya que algunos tienen entre 8 y 40 unidades de sacáridos, mientras que otros pueden alcanzar hasta miles de sacáridos (Spaink, 2000). Los EPS más estudiados son el succinoglicano, o EPS I, y el galactoglucano, o EPS II, ambos producidos por *S. meliloti* (Figura 7) (Mithöfer, 2002). Los EPS I están formados por subunidades repetitivas de octasacáridos modificados con un sustituyente acetilo, succinilo y piruvilo por subunidad. En ambos tipos de EPS se pueden encontrar dos formas de alto y bajo peso molecular. Los EPS de bajo peso molecular han tenido particular interés en los estudios de simbiosis, ya que el agregado exógeno de los mismos complementa los defectos en la capacidad de infección que se observan en mutantes de *S.*

meliloti incapaces de producir ambos tipos de EPS (Battisti et al., 1992; Djordjevic et al., 1987).

Numerosos estudios realizados con distintos mutantes de rizobios alterados en la producción de EPS han demostrado que estos polisacáridos desempeñan un rol importante en la infección de los nódulos, particularmente en la etapa de formación de hilos de infección (Dylan et al., 1986, Niehaus et al., 1993). Sin embargo el fenotipo simbiótico de dichas mutantes depende del tipo de nódulo que se establezca. En este sentido, los EPS son necesarios para la infección de nódulos indeterminados, pero no serían indispensables para la infección de nódulos determinados (Hotter & Scott, 1991). Estudios realizados en nódulos indeterminados de alfalfa colonizados por *S. meliloti* sugieren que los EPS de este rizobio están involucrados en la supresión de respuestas de defensa de la planta hospedante (Niehaus et al., 1993, Mithöfer, 2002).

2. 1. 1. 2.- LPS

Los LPS se localizan en la superficie extracelular de la bacteria y tienen una estructura muy compleja y variable entre los distintos rizobios. Su estructura consiste de: 1) un lípido A, el cual está localizado en la membrana externa; 2) el 'Core', conformado por azúcares tales como el 2-ceto-3-deoxioctonato (KDO) y 3) el antígeno O, compuesto por azúcares que son variables entre cepas de la misma especie (Nikaido & Vaara, 1985). Estudios realizados con rizobios que tienen alterada la síntesis de LPS sugieren que estos compuestos desempeñan roles importantes durante los procesos de infección, específicamente en la liberación del bacteroide desde el hilo de infección hacia el citoplasma de la célula hospedante y en el desarrollo del simbiosoma (Kannenberg et al., 1998) (Figura 7).

Otros estudios relacionados con los anteriores indicaron que estos compuestos participan en la supresión de respuestas de defensa de la planta (Perotto, et al., 1994), de manera análoga a los LPS de algunos patógenos de plantas (Schoonejans et al., 1987).

2. 1. 1. 3.- β -glucanos cíclicos

Los glucanos cíclicos se han reportado en especies del grupo α y β de proteobacterias. Estos polisacáridos están formados por glucosa unidas generalmente por enlaces $\beta(1-2)$ ó $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, con un grado de polimerización (11-40) y sustitución (fosfoglicerol, fosfocolina, succinato o metilmalonato) que varían de acuerdo a la especie bacteriana (Figura 6) (Breedveld & Miller, 1994). Se han encontrado glucanos cíclicos en todas las especies de rizobios que establecen simbiosis con leguminosas (familias II y III) y también en bacterias patógenas de plantas como las especies *A. tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Xantomonas campestris*, y bacterias patógenas de animales (*Brucella*, spp). Estas especies patógenas pertenecen a la familia IV de glucanos (ver Figura 6, sección 2). Estos polisacáridos se acumulan en el espacio periplásmico y pueden encontrarse en el entorno extracelular, dependiendo de las condiciones de cultivo y de la etapa de crecimiento de la bacteria (Geiger et al., 1991). Hay evidencias que demuestran que la síntesis de glucanos cíclicos en algunos géneros de rizobios (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) está regulada por la osmolaridad del medio, observándose un aumento de la misma en condiciones hipoosmóticas (Breedveld & Miller, 1994). A partir de estos resultados, se ha sugerido que los glucanos cíclicos periplásmicos desempeñan un rol en la adaptación de los rizobios a condiciones hipoosmóticas (Breedveld & Miller, 1994).

Es interesante resaltar que la estructura química de los glucanos cíclicos y los genes que codifican para enzimas involucradas en su biosíntesis, presentan diferencias significativas entre rizobios de crecimiento rápido y lento. En este sentido, las primeras sintetizan generalmente glucanos cíclicos con enlaces $\beta(1-2)$, mientras que las segundas sintetizan solamente glucanos cíclicos con enlaces $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (Breedveld & Miller, 1994). Sin embargo, no se han analizado aún los tipos de glucanos que producen la totalidad de los rizobios para establecer una regla general respecto a la relación entre la velocidad de crecimiento de los rizobios y el tipo de enlace de los glucanos respectivos.

Numerosos trabajos han aportado evidencias de que los glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ son cruciales para la invasión del nódulo por rizobios y la virulencia de *Agrobacterium* spp (Puvanesarajah et al., 1985; Dylan et al., 1986; Geremia et al., 1987). Por otra parte, trabajos más recientes sugieren que en *B. japonicum*,

una especie que sintetiza glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, la estructura química de estos polisacáridos es importante para lograr un simbiosis efectiva (Bhagwat et al., 1999). Otros trabajos demostraron que los glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ de *B. japonicum* inhiben de manera competitiva la unión de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ de hongos, los cuales actúan como elicitores de mecanismos de defensa en plantas de soja, supuestamente mediante la unión a una proteína receptora de membrana de la leguminosa (Mithöfer et al., 1996).

Los glucanos cíclicos de *B. japonicum* también inhiben la producción de fitoalexinas inducida por el daño mecánico en cotiledones de soja; así como reacciones de transducción de señales relacionadas con el movimiento de calcio en plantas de soja transgénicas que expresan acuaporinas (Mithöfer, 1999). Estos resultados sugieren que los glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ podrían funcionar como supresores de respuestas de defensa de la soja, el hospedante específico de *B. japonicum*, permitiendo la invasión y colonización del nódulo por parte de este último (Bhagwat et al., 1999). Por otra parte, no se ha descrito aún si los glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ desempeñan una función supresora similar a la descrita para los glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ de *B. japonicum*. En este sentido se desconoce si ambos tipos de glucanos son homólogos funcionales para dicho rol.

Por otro lado, en la interacción entre distintos rizobios y leguminosas del género *Lotus*, es llamativa la correlación que existe entre la velocidad de crecimiento de los primeros y su especificidad para formar nódulos efectivos en ciertos hospedantes (ver sección 1.1.2.3.4) Teniendo en cuenta todo lo expuesto en párrafos precedentes, cabe la posibilidad de que la especificidad de la interacción rizobio-*Lotus* spp dependa, al menos en parte, de la capacidad de los primeros de sintetizar glucanos cíclicos con determinado tipo de enlace y estructura.

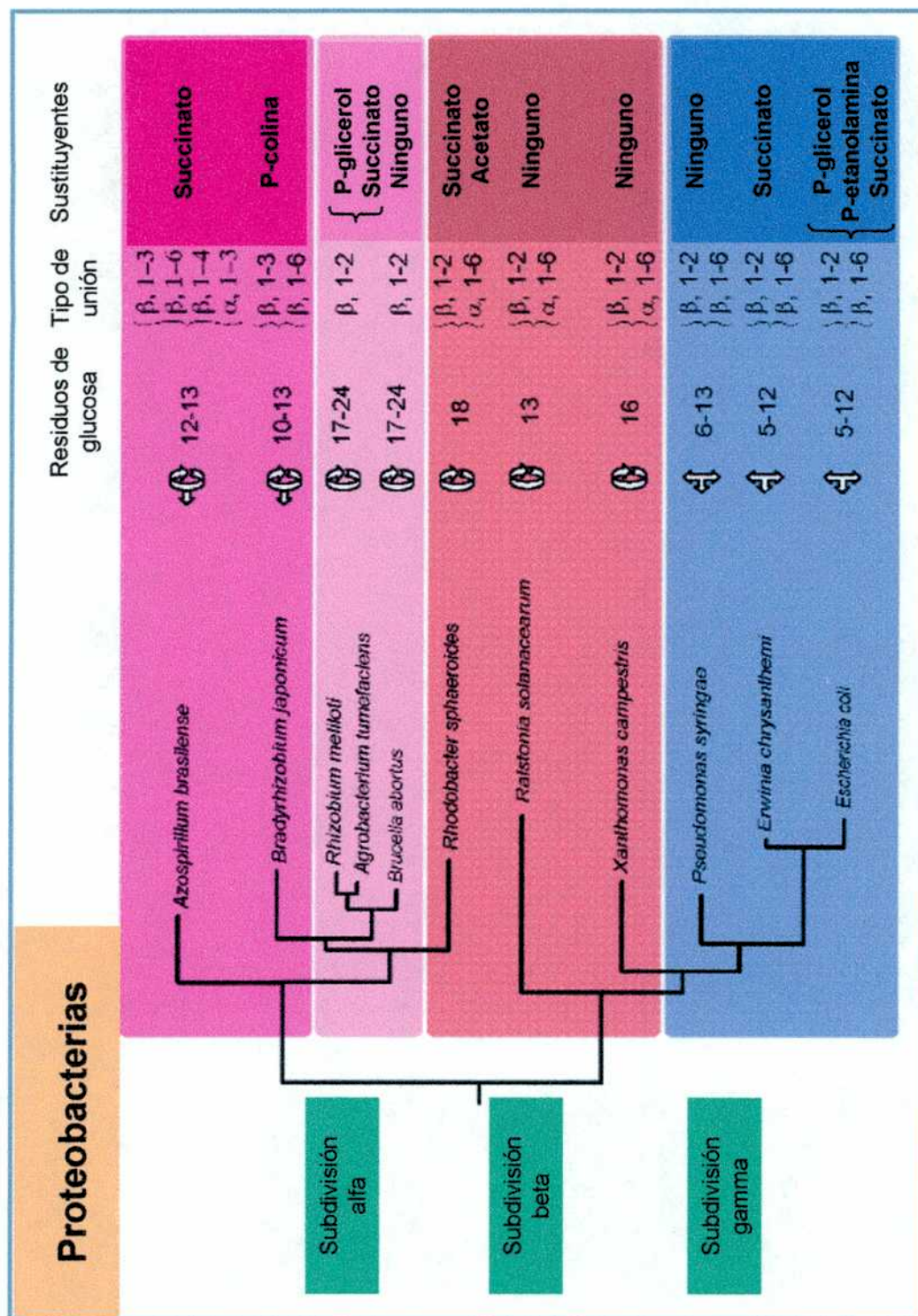


Figura 6.- Características estructurales de los glucanos acumulados en especies de las tres subdivisiones del grupo de Proteobacterias o bacterias púrpuras.

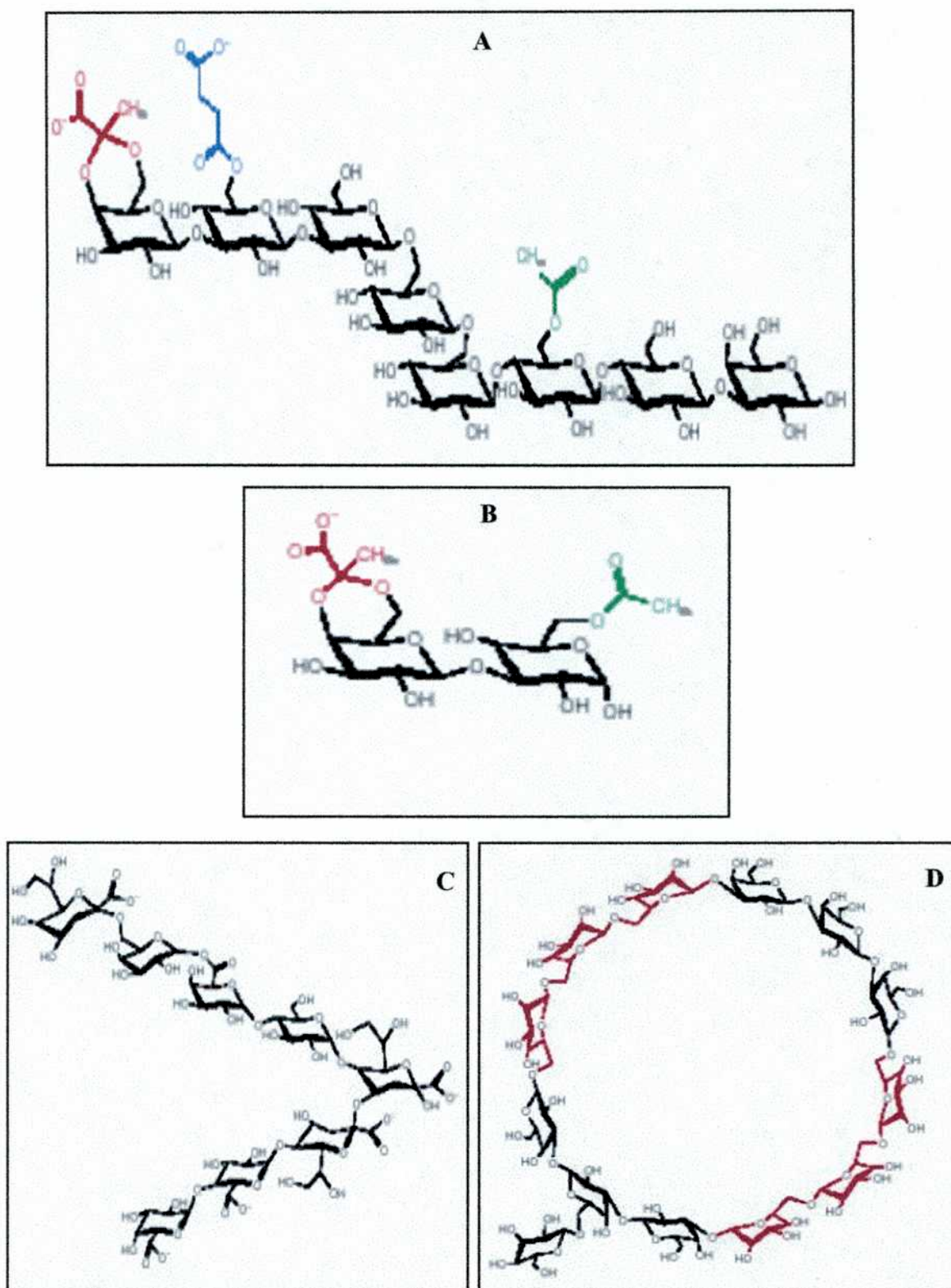


Figura 7.- Polisacáridos estructurales de origen bacteriano. **A**, exopolisacáridos tipo I (EPS I); **B**, exopolisacáridos de tipo II (EPS II); **C**, lipopolisacáridos (LPS); **D**, glucanos cíclicos β (1,3) β (1,6).

2. 2.- BIOSÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS EN RIZOBIOS

Las vías de síntesis de polisacáridos de superficie (EPS, LPS, glucanos cíclicos) y del polisacárido de reserva glucógeno, están estrechamente relacionadas desde el punto de vista metabólico. La glucosa 1-P es el precursor común para la síntesis de todos estos polisacáridos. Dicho compuesto es sintetizado por la enzima fosfoglucomutasa (Pgm), que utiliza glucosa 6-P (Glc 6-P) para generar glucosa 1-P (Glc1-P). A partir de la Glc1-P se sintetiza UDP-glucosa (UDPGlc) y ADP-glucosa (ADPGlc). La UDPGlc es utilizada para la síntesis de distintos polisacáridos estructurales, como EPS, LPS y glucanos cíclicos y también para el disacárido trealosa (Figura 8). Por otro lado, la ADPGlc es utilizada para la síntesis de glucógeno. En este sentido, cualquier alteración en los niveles de fosfoglucomutasa puede afectar la producción de los polisacáridos de glucosa, ya que se modifica directamente la disponibilidad de UDPGlc o ADPGlc.

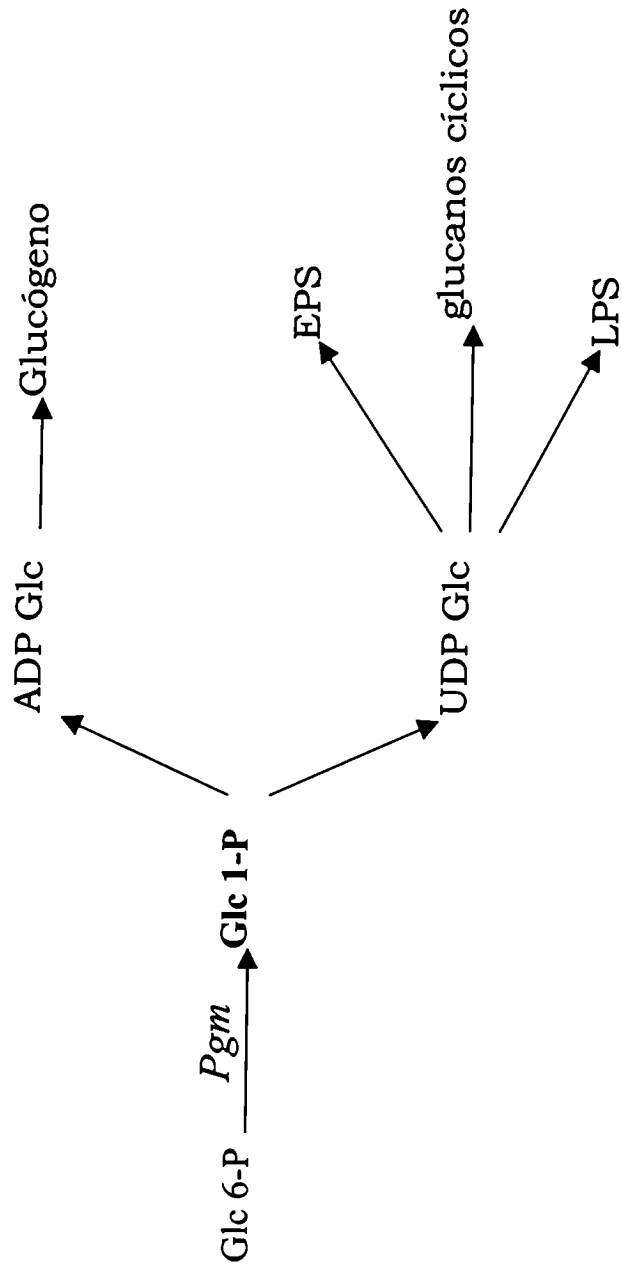


Figura 8.- La glucosa 1-P como precursor para la síntesis de polisacáridos en rizobios

Distintos trabajos coinciden en que una mutación que modifique la actividad de la enzima Pgm puede afectar el metabolismo de distintos polisacáridos, e incluso la viabilidad de los rizobios (Leigh et al., 1985; Cangelosi et al., 1987; Marroquí et al., 2001; Lepek et al., 2002). En particular, se demostró que una mutación que altera la actividad de esta enzima en *R. tropici* es letal (Marroquí et al., 2001). En cambio, en *M. loti* esta mutación no tiene el mismo efecto, pero se observa una alteración en la composición de LPS, ausencia de EPS, glucanos cíclicos y glucógeno, así como también una incapacidad de formar nódulos (Lepek et al., 2002). En forma semejante, mutantes de Pgm de *S. meliloti* y *A. tumefaciens* no producen EPS, tienen alteraciones en la producción de LPS, menor movilidad y defectos en la simbiosis (Cangelosi, et al., 1987) y la virulencia (Leigh et al., 1985) de dichas especies, respectivamente.

Por otra parte, una mutación en el gen *glgA* (glucógeno sintasa) de *R. tropici* produjo además de ausencia de glucógeno, modificaciones en los niveles de EPS, que como mencionamos anteriormente, cumplen un rol importante en distintas etapas de la simbiosis (Hotter & Scott, 1991; Mithöfer, 2002). Sin embargo, no se detectaron efectos semejantes en mutantes del mismo gen en *M. Loti* (Lepek et al., 2002). Los resultados antes mencionados sugieren que la biosíntesis de estos polisacáridos podría estar regulada de manera diferente en distintos rizobios. En este sentido sería importante conocer los mecanismos de regulación de la biosíntesis de polisacáridos en diferentes especies de rizobios, ya que esto contribuiría a una mejor comprensión del rol que desempeñan por tales polímeros en la simbiosis mutualista con leguminosas.

2. 2. 1.- BIOSÍNTESIS DE GLUCANOS CÍCLICOS

La síntesis *in vitro* de glucanos fue estudiada por primera vez por Dedonder y Hassid (1964) usando extractos de membranas libres de células de *R. japonicum* incubados con (¹⁴C)UDPGlc. Luego, los estudios se extendieron a especies como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Amemura, 1984), *S. meliloti* (Zorreguieta et al., 1985a) y *A. tumefaciens* (Zorreguieta et al., 1985b). En general, especies de crecimiento rápido como *A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *M. loti* y *R. fredii* producen glucanos β (1-2) con diferentes grados de polimerización y sustitución. Sin embargo, se ha reportado la presencia de glucanos cíclicos con uniones β (1-2), β (1-3), β (1-6) en *R. japonicum*, una especie considerada de crecimiento rápido (Breedveld & Miller, 1994).

La síntesis de glucanos cíclicos β (1-2) se realiza en varias etapas: En primer lugar ocurre la síntesis del nucleótido azúcar UDPGlc a partir de UTP y Glc 1P (figura 9), reacción catalizada por la enzima UDPGlc pirofosforilasa (UTP:glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, E.C. 2.7.7.9). Luego, una β (1-2) glucano sintasa de 319 kDa ubicada en la membrana interna de los rizobios interviene en la elongación del polímero lineal de unidades de glucosa (Figura 9). El grupo glucosilo de la UDPGlc es transferido a una cadena de β -1,2 glucano en crecimiento para formar una nueva unión β -1,2 glucosídica (glucano lineal). Se ha demostrado que durante esta etapa, el glucano permanece unido a la proteína de 319 kDa antedicha (Zorreguieta et al., 1985b; Zorreguieta & Ugalde, 1986). Finalmente ocurre la ciclación del oligosacárido (Figura 9) y la liberación de la proteína. Se ha demostrado que dicha reacción, catalizada también por la β (1-2) glucano sintasa de 319 kDa (Zorreguieta & Ugalde, 1986; Iñon de Iannino & Ugalde, 1989), es energéticamente posible cuando se han incorporado entre 15 y 17 residuos de glucosa a la cadena lineal (Paleschi & Crescenzi, 1985; Williamson et al., 1992).

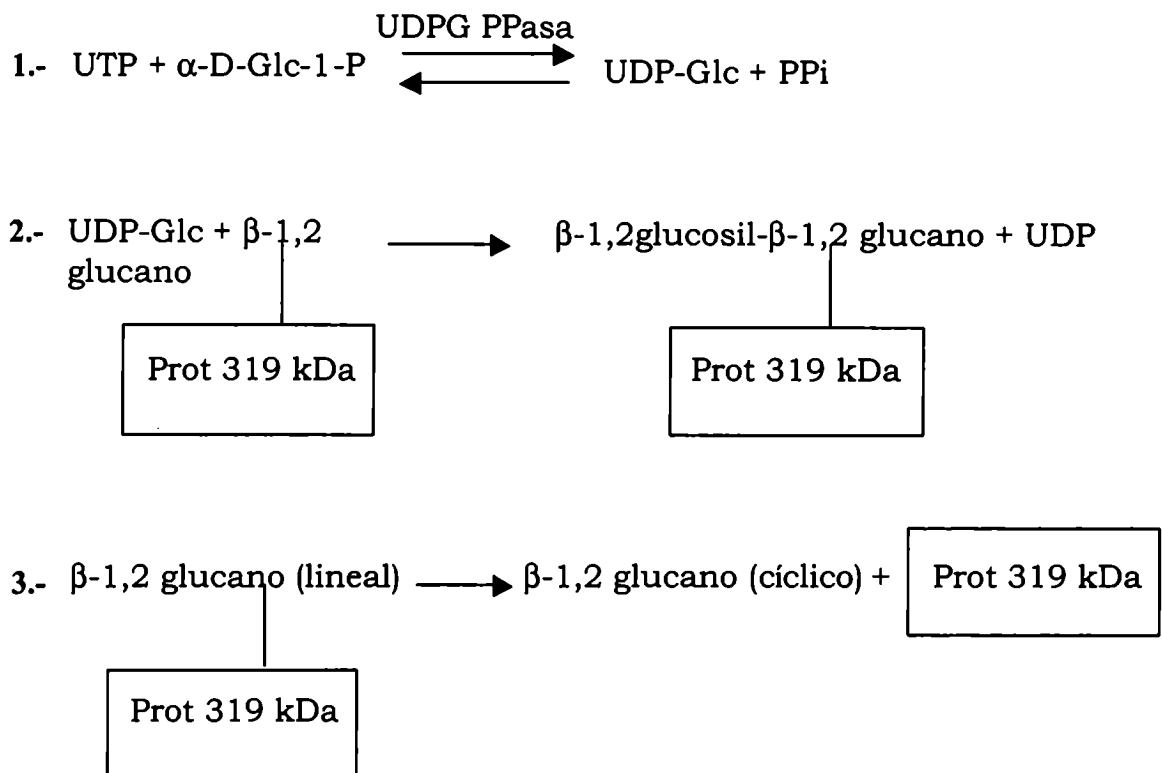


Figura 9.- Etapas de la síntesis de glucano $\beta\text{-1,2}$ cíclico. UDPG PPasa, UDP Glucosa pirofosforilasa. Prot 319 kDa, $\beta(1\text{-}2)$ glucano sintasa

Por otra parte, especies de crecimiento lento como *B. japonicum* sintetizan glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (Miller, 1990; Tully, et al., 1990; Iñón de Iannino & Ugalde, 1993) y glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ sustituidos con fosfocolina (Rolin et al., 1992). En estas bacterias de crecimiento lento se detectó la actividad de una nueva glucosiltransferasa que interviene en la síntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (Cohen & Miller, 1991; Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). Los estudios referentes a la biosíntesis de este tipo de glucano se han realizado en *B. japonicum* USDA 110 y cepas de *Bradyrhizobium* que forman nódulos con árboles del sudeste de Brasil (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). En dichas cepas se encontraron proteínas intermediarias de 90 y 100 kDa, respectivamente, las cuales estarían involucradas en la biosíntesis de glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$. Estos datos sugieren que la presencia de proteínas intermediarias es una característica inherente a la síntesis de glucanos cíclicos tanto en rizobios de crecimiento rápido como en los de crecimiento lento. Tal como se mencionó en la sección 2.1.1.3, las especies de crecimiento rápido generalmente sintetizan glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ y las de crecimiento lento sintetizan glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). Sin embargo, los estudios realizados en cepas de crecimiento lento han abarcado un número reducido de especies, y por consiguiente sería interesante determinar si otras especies de crecimiento lento comparten dicha característica.

2. 2. 1. 1.- GENES ESTRUCTURALES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE GLUCANOS CÍCLICOS

Los genes relacionados con la síntesis y secreción de glucanos cíclicos fueron caracterizados por primera vez en especies de crecimiento rápido como *A. tumefaciens* y *S. meliloti*. En la primera, los loci se denominaron *chvB* y *chvA* (Douglas et al., 1985) y codifican para enzimas involucradas en la síntesis y secreción respectivamente. Estos genes son homólogos y funcionalmente complementarios a los genes *ndvB* y *ndvA* de *S. meliloti* (Dylan et al., 1986; O'Connell & Handselman, 1989).

Los genes *ndvB* y *chvB* codifican para proteínas de membrana interna (NdvB y ChvB) con una masa molecular inicialmente estimada en 235 kDa por electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS. Estas proteínas poseen actividad de glucosil transferasas $\beta(1-2)$ y participan en la síntesis y ciclación del glucano $\beta(1-2)$ (ver sección 2.2.1) (Zorreguieta & Ugalde, 1986). Posteriormente, la determinación de la secuencia nucleotídica del gen *ndvB* permitió estimar que la proteína codificada por el mismo tiene en realidad una masa molecular de 319 kDa (Ielpi et al., 1990).

Por otro lado, el producto del gen *ndvA* es una proteína de 67 kDa, presumiblemente situada en la membrana plasmática, e involucrada en la translocación de los glucanos cíclicos desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico. La misma tiene homología estructural con proteínas de transporte que unen ATP en *E. coli* (Stanfield et al., 1988). El gen *chvA* codifica para una proteína de 75 kDa, y se ha propuesto que la misma forma un complejo con la proteína de 319 kDa. Dicho complejo sería responsable de la síntesis, secreción y modificación del glucano $\beta(1-2)$ en *A. tumefaciens* (Iñón de Iannino & Ugalde, 1989).

Otros autores (Bhagwat & Keister, 1995; Bhagwat et al., 1996) identificaron dos genes relacionados con la biosíntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ en *B. japonicum*: *ndvC* y *ndvB*. Se supone que los mismos codifican para una $\beta(1-6)$ glucosil transferasa (NdvC) (Bhagwat et al., 1996) y una $\beta(1-3)$ glucano sintasa (NdvB) (Bhagwat & Keister, 1995). La proteína NdvB tiene 920 aminoácidos, una masa molecular teórica de 98,6 kDa mientras la proteína NdvC

tiene 555 aminoácidos y una masa molecular teórica de 61 kDa. Cuando se analizaron mutantes de *B. japonicum* en estos genes, se observó una alteración en la estructura y la síntesis de glucanos, y el fenotipo simbiótico resultó alterado. En este sentido, una mutante en el gen *ndvB* no puede sintetizar glucanos cíclicos (Bhagwat & Keister, 1995) y forma nódulos inefectivos; mientras que una mutante en el gen *ndvC* produce glucanos cíclicos con enlaces $\beta(1-3)$ exclusivamente, y forma numerosos pseudonódulos sin bacteroides en su interior. Tales nódulos tienen el aspecto de tumores y no son efectivos (Dunlap et al., 1996; Bhagwat et al., 1996). A partir de estos resultados, se postuló un mecanismo de síntesis para los glucanos cíclicos de *B. japonicum*, en el cual los residuos de glucosa unidos por enlaces $\beta(1-6)$ se agregarían en forma simultánea o posterior a la síntesis de la cadena de glucosas unidas por enlaces $\beta(1-3)$. De este modo, en ausencia de cadenas con uniones $\beta(1-3)$, no tendría lugar la síntesis de glucanos en estas bacterias. Esta hipótesis está de acuerdo con las observaciones realizadas con la mutante *ndvB* que es incapaz de sintetizar glucanos cíclicos aunque tiene una copia funcional del gen *ndvC* (Bhagwat et al., 1999). La proteína putativa NdvC tiene una región similar a otras enzimas involucradas en el metabolismo de β -glucanos, tales como las β -glucano sintasas Kre6p y SKn1p de levaduras (Bhagwat et al., 1996).

Si bien aún no se conoce cómo ocurre la biosíntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, los resultados obtenidos con las mutantes *ndvB* y *ndvC* de *B. japonicum* demuestran que, al menos el mecanismo de polimerización, ciclación y excreción sería diferente y más complejo que el reportado para la síntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ (Iñón de Iannino & Ugalde, 1989). Además es importante aclarar que no se encontró homología a nivel de la secuencia nucleotídica entre los genes que participan en la biosíntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-2)$ y los que participan en la biosíntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$.

2. 2. 2.- BIOSÍNTESIS DE GLUCÓGENO

Si bien son escasos los estudios relacionados con el metabolismo del glucógeno en rizobios, se sabe que la disponibilidad de una fuente de glucosa es esencial para que el bacteroide sintetice dicho polímero dentro del nódulo (Lodwig & Poole, 2003). Los mono y disacáridos no pueden ser transportados a través de la membrana peribacteroidea hacia el interior de los bacteroides (Udvardi et al., 1990), lo que sugiere que estos últimos deben obtener glucosa vía gluconeogénesis, glucogenolisis o por difusión pasiva.

Una de las enzimas de la gluconeogénesis, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), cataliza la transformación de oxaloacetato en fosfoenolpiruvato (PEP). Esta enzima interviene en la primera etapa de conversión de intermediarios del ciclo del TCA en hexosas. Mutantes de *S. meliloti* y *Rhizobium* NGR234 en el gen *pckA*, que codifica para la enzima PEPCK, tienen reducida su capacidad de fijar nitrógeno en *Medicago sativa* y en *Leucaena leucocephala* y *Macropitium atropurpureum*, respectivamente (Finan et al., 1991; Osteras et al., 1991). Sin embargo, la mutación del mismo gen no alteró la capacidad *R. leguminosarum* bv. *viciae* de fijar nitrógeno en su hospedante natural (arveja) (McKay et al., 1985). Estos resultados demuestran que existen diferencias entre los distintos rizobios, en su capacidad para obtener hexosas vía gluconeogénesis y en la permeabilidad de la membrana peribacteroidea a los mono y disacáridos. En este sentido, los bacteroides de *R. leguminosarum* bv. *viciae* pueden obtener estos azúcares por difusión pasiva desde el citoplasma de la célula vegetal, mientras que los bacteroides de *S. meliloti* (Finan et al., 1991) y *Rhizobium* NGR234 dependen de la gluconeogénesis (Osteras et al., 1991).

El metabolismo de glucógeno ha sido extensamente estudiado en distintas bacterias, particularmente las Gram negativas (Preiss & Romeo, 1989; Iglesias & Preiss, 1992; Ballicora et al., 2003), pero es escasa la información disponible en relación con bacterias que establecen simbiosis con leguminosas. Numerosos estudios han determinado que en bacterias, la tasa de acumulación de glucógeno está controlada principalmente a nivel post-traducciona, a través de la regulación de la enzima ADPglucosa pirofosforilasa (ADPGlc PPasa) por efectores alostéricos (Preiss, 1999). Esta enzima está codificada por uno de los genes que participan en la biosíntesis de glucógeno.

En *E. coli*, y probablemente también en rizobios, la vía de síntesis de este α -glucano comienza con la isomerización de la Glc 6-P a Glc 1-P, reacción catalizada por la enzima Pgm (Preiss & Romeo, 1994). En la figura 10 se muestra cómo ocurre la síntesis y degradación de glucógeno en bacterias y probablemente en los distintos rizobios.

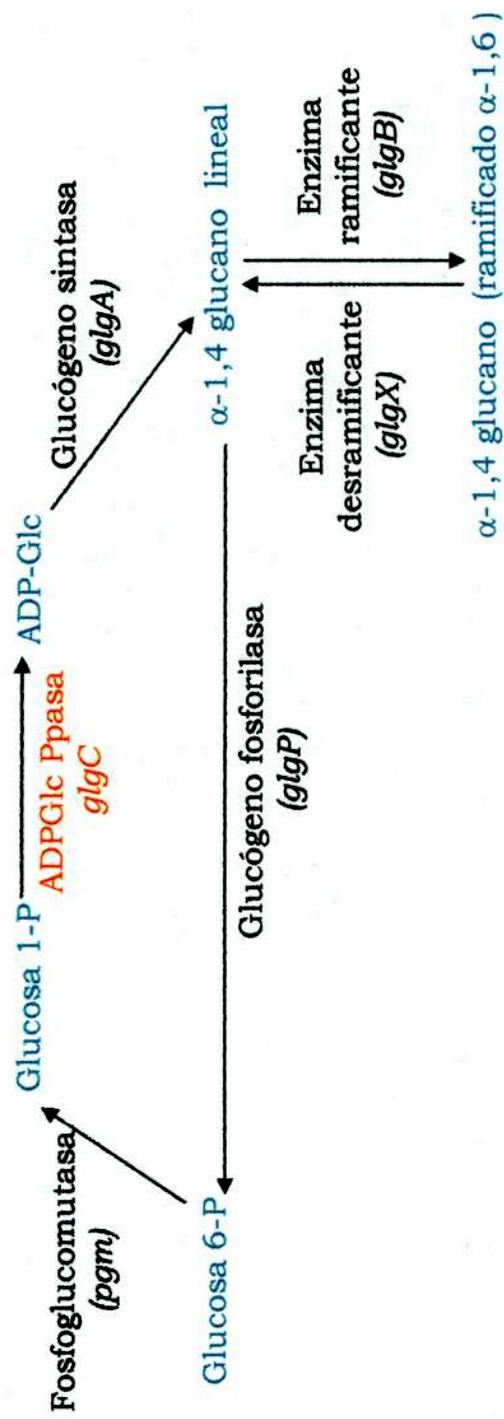


Figura 10.- Vías de síntesis y degradación de glucógeno en rizobios

Las distintas reacciones involucradas en la biosíntesis de glucógeno son las siguientes:

- 1.- $\text{ATP} + \alpha\text{-Glc-1-P} \rightleftharpoons \text{ADP-Glc} + \text{PPi}$
- 2.- $\text{ADP-Glc} + \alpha\text{-1,4 glucano} \longrightarrow \alpha\text{-1,4 glucosil-}\alpha\text{-1,4 glucano} + \text{ADP}$
- 3.- $\alpha\text{-1,4 glucano (lineal)} \longrightarrow \alpha\text{-1,4 glucano (ramificado } \alpha\text{-1,6)}$

En primer lugar, el nucleótido-azúcar ADPGlc es sintetizado por la enzima ADPGlc PPasa (ATP: glucosa-1-fosfato adenililtransferasa; EC 2.7.7.27). *In vivo*, esta etapa es irreversible debido a la presencia de la pirofosfatasa inorgánica, la cual desplaza el equilibrio de la reacción hacia la síntesis de ADPGlc (Ballicora et al., 2003). En la segunda reacción, el grupo glucosilo de la ADPGlc es transferido a una cadena de glucano $\alpha\text{-1,4}$ en crecimiento (glucógeno) para formar una nueva unión glucosídica $\alpha\text{-1,4}$. Esta reacción es catalizada por la glucógeno sintasa específica de ADPGlc (ADPGlc: 1,4- $\alpha\text{-D-glucano 4-}\alpha\text{-glucosiltransferasa}$; EC 2.4.1.21, abrev. GS) (Preiss, 1999). La última reacción es catalizada por la enzima ramificante del glucógeno (1,4- $\alpha\text{-D-glucano: 1,4-}\alpha\text{-D-glucano 6-glucosiltransferasa}$, EC 2.4.1.18, abrev. BE) responsable de la síntesis de las uniones glucosídicas $\alpha\text{-1,6}$, a partir de los cuales se forman las ramificaciones presentes en el glucógeno (Preiss, 1999; Ballicora et al., 2003).

Estudios realizados con mutantes bacterianas que sobreproducen o tienen una baja producción de glucógeno demostraron que los niveles de este polisacárido en cada mutante se correlacionan positivamente con sus niveles de actividad de GS o ADPGlc PPasa (Preiss & Romeo, 1989).

2. 2. 2. 1.- GENES ESTRUCTURALES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE GLUCÓGENO

Los genes bacterianos que codifican para las enzimas del metabolismo del glucógeno fueron estudiados inicialmente en *E. coli* y *S. thyphymurium* (Preiss, 1984), organismos en los cuales estos genes se encuentran agrupados en un operón, con el ordenamiento mostrado en la Figura 11. En los últimos años, se han caracterizado los genes del metabolismo de glucógeno de *A. tumefaciens* (Uttaro et al., 1994; Ugalde et al., 1998), *M. loti* (Lepek et al., 2002), *R. tropici* (Marroquí et al., 2001) y *S. meliloti* (Galibert et al., 2001). Sin embargo, la organización de estos genes en el cromosoma sólo se han estudiado en *A. tumefaciens* (Ugalde et al., 1998), *R. tropici* (Marroquí et al., 2001) y *M. loti* (Lepek et al., 2002). En estos tres organismos se encontró que, de manera similar a lo reportado en otras bacterias, los genes *glgP* (glucógeno fosforilasa), *glgB* (enzima ramificante), *glgC* (ADPGlcPPasa), *glgA* (glucógeno sintasa) y *pgm* (fosfoglucomutasa) forman parte de un operón. Además, el ordenamiento de los mismos es similar entre estas especies. Por otra parte, los genes cromosomales para la síntesis de glucógeno de *S. meliloti* también conforman un operón, pero en esta bacteria existen además copias de algunos de estos genes en el plásmido pSym, los cuales no

están agrupados (Galibert et al., 2001) (Figura 11). Recientemente, se ha publicado la secuencia del genoma completo de *B. japonicum* (Kaneko et al., 2002) y se ha observado que la organización de los genes del metabolismo del glucógeno es distinta a la reportada en el resto de las bacterias antes mencionadas.

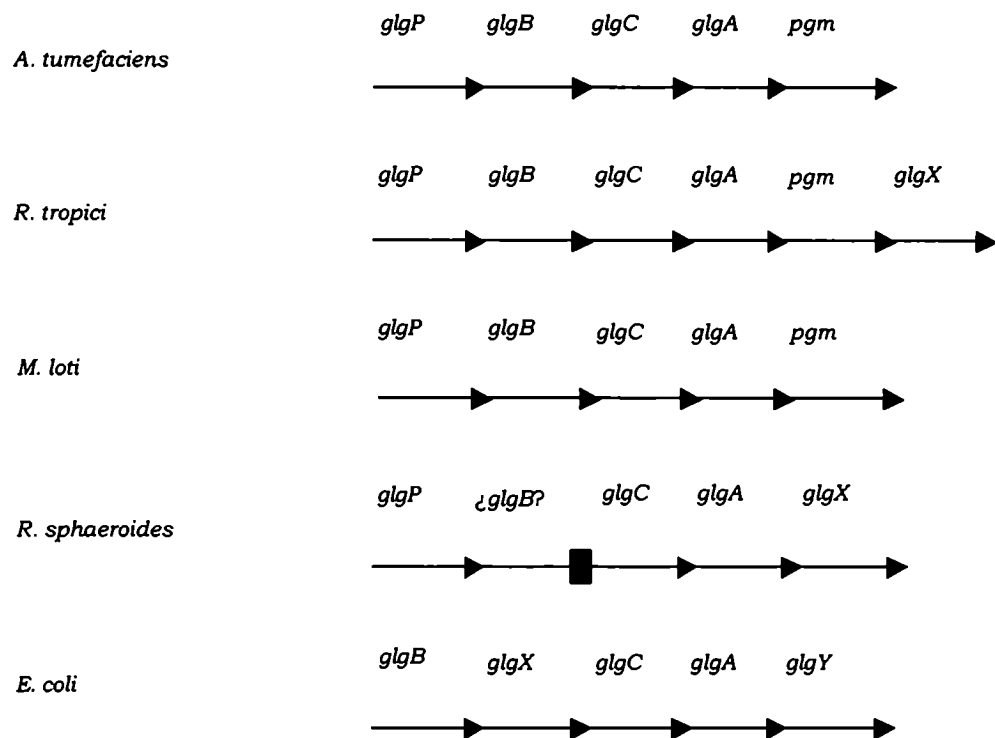


Figura 11.- Organización de los genes estructurales del metabolismo del glucógeno en bacterias. *glgP*, glucógeno fosforilasa; *glgB*, enzima ramificante; *glgC*, ADPGlucosa pirofosforilasa; *glgA*, glucógeno sintasa; *glgX*, enzima desramificante; *pgm*, fosfoglucmutasa.

2. 2. 2. 2.- REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO

La síntesis de glucógeno en bacterias está regulada a nivel transcripcional y post-traducciona (Preiss, 1984; Romeo & Preiss, 1989). En *E. coli*, los genes *glgC* y *glgA* dan origen a un único transcripto, y la regulación transcripcional de la expresión de los mismos, requiere de los productos de los genes *crp* y *cyaI*. Estos últimos codifican para la proteína adenilato ciclasa y la proteína receptora de AMP cíclico (CRP), respectivamente (Romeo & Preiss, 1989). En presencia de AMPc y CRP aumenta la transcripción acoplada de los genes *glgC* y *glgA*. En este sentido, se ha demostrado que el complejo AMPc-CRP se une a una región del ADN situada corriente arriba del gen *glgC* de *E. coli* (Romeo & Preiss, 1989). Además, la guanósina 5'-difosfato 3'-difosfato también estimula la transcripción de estos genes (Romeo & Preiss, 1989). Por otra parte, como se describe en la sección siguiente, la regulación de la actividad de la ADPGlc PPasa, es el principal punto de control a nivel pos-traducciona de la biosíntesis de glucógeno (Preiss, 1999).

2. 2. 2. 2. 1.- Estructura y regulación de la ADPGlc PPasa

En bacterias, la ADPGlc PPasa está codificada por un solo gen y forma un homotetrámero (α_4) con una masa molecular aproximada de 200 kDa (Iglesias & Preiss, 1992; Ballicora et al., 2003). Las enzimas de *Bacillus subtilis* y de *B. stearothermophilus* constituyen una excepción a esta regla, ya que tienen una estructura heterotetramérica (Takata et al., 1997) (Tabla 3).

La ADPGlc PPasa está altamente regulada por diferentes metabolitos que actúan como efectores alostéricos, y es la enzima que limita el flujo en la vía de síntesis de glucógeno en bacterias, así como también en la vía de síntesis de almidón en plantas (Iglesias & Preiss, 1992). La actividad de esta enzima depende del estado energético de la célula y de la concentración intracelular de efectores que pueden modificar la velocidad máxima de la reacción (V_{max}) y la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima ($S_{0.5}$) (Preiss, 1996; Ballicora et al., 2003).

La especificidad de la enzima por determinados reguladores alostéricos depende del organismo en cuestión y está relacionada con la vía principal de asimilación del carbono que opera en el mismo. De este modo, los organismos que poseen vías similares de asimilación del carbono, tienen ADPGlc PPasas reguladas por metabolitos similares que actúan como activadores o inhibidores de la enzima (Tabla 3) (Iglesias & Preiss, 1992; Ballicora et al., 2003).

En la Tabla 3 se resumen las propiedades estructurales y regulatorias de las distintas ADPGlc PPasas de bacterias y la vía principal de asimilación del carbono en cada organismo. Se distinguen diferentes clases o tipos de ADPGlc PPasas de acuerdo a la especificidad que presentan por el tipo de activador alostérico.

Organismo	Principal vía de metabolismo del carbono	Principal polisacárido de reserva	Clase	ADPGlc Pasa		
				Reguladores alostéricos Activador(es)	Inhibidor(es)	Estructura cuaternaria
Enterobacterias						
<i>Escherichia coli</i>	Embden-Meyerhof	Glucógeno	I	Fru-1,6 bisP	AMP	Homotetrámero (α_4)
<i>Salmonella typhimurium</i>						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Embden-Meyerhof	Glucógeno	II	Fru-1,6 bisP Fru-6 P	AMP AMP	Homotetrámero (α_4)
<i>Aeromonas formicans</i>						
<i>Micrococcus luteus</i>						
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Embden-Meyerhof	Glucógeno	III	Ninguno	AMP	Homotetrámero (α_4)
<i>Serratia marcescens</i>						
<i>Enterobacter hafniae</i>						
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Entner-Doudoroff	Glucógeno	IV	Piruvato Fru-6 P	AMP AMP	Homotetrámero (α_4)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>						
<i>Arthrobacter viscosus</i>						
<i>Chromatium vinosum</i>						
<i>Rhodobacter capsulata</i>						
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>						
<i>Rhodobacter gelatinosa</i>	Embden-Meyerhof y Entner-Doudoroff	Glucógeno	V	Piruvato Fru-6 P Fru-1,6 bisP	AMP Pi	Homotetrámero (α_4)
<i>Rhodobacter globiformis</i>						
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>						
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Ciclo ATC y ciclo reductivo de los ácidos carboxílicos	Glucógeno	VI	Piruvato	Ninguno	Homotetrámero (α_4)
<i>Rhodospirillum tenue</i>						
<i>Bacillus subtilis</i>	Ciclo ATC durante la esporulación	Glucógeno	VII	Ninguno	Ninguno	Heterotetrámero ($\alpha_3\beta_2$)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>						
Cianobacterias						
<i>Synechococcus</i> sp cepa PCC 6301	Vía reductiva de las pentosas fosfato (VRPF)	Glucógeno	VIII	3-PGA	Pi	Homotetrámero (α_4)
<i>Synechocystis</i> sp cepa PCC 6803						
<i>Anabaena</i> sp cepa PCC 7120						

Tabla 3. Metabolismo del carbono y propiedades de las ADPGlc PPasas bacterianas.

En las bacterias que utilizan la vía de Embden-Meyerhof (EM) para metabolizar la glucosa, la ADPGlc PPasa es activada por Fru1-6bisP e inhibida por AMP (Preiss, 1984; Iglesias & Preiss, 1992). Dicha vía glucolítica está regulada por la enzima alostérica fosfofructokinasa (PFK), la cual cataliza la síntesis de Fru1-6 bisP. Esta enzima es regulada de manera inversa a la ADPGlc PPasa, ya que resulta activada por altos niveles de AMP e inhibida en presencia de exceso de ATP. Así, la vía glucolítica y la vía de síntesis de glucógeno están inversamente reguladas. Cuando hay un aumento de la relación ATP/AMP, la glicólisis es inhibida a nivel de la PFK y se acumulan intermediarios tales como la Fru1-6 bisP, los cuales son utilizados como precursores para la síntesis de glucógeno.

Las bacterias pertenecientes al grupo representado por *A. tumefaciens* y *Rhodobacter capsulata* utilizan principalmente la vía Entner- Doudoroff (ED) para metabolizar la glucosa. En estas bacterias, la Fru-6P y el piruvato son los principales activadores de la ADPGlc PPasa, mientras que el AMP y ADP actúan como inhibidores de la misma (Iglesias & Preiss, 1992) .

Por otro lado, bacterias anaeróbicas fotosintéticas heterotróficas tales como *Rhodobacter globiformis*, *R. sphaeroides* y *R. gelatinosa*, utilizan la glucólisis o la vía de ED para metabolizar hexosas. La ADPGlc PPasa de este grupo de bacterias es altamente regulada, siendo activada por un amplio rango de metabolitos, tales como Fru-6P, Fru1-6 bisP y piruvato, e inhibida por AMP y Pi (Preiss & Romeo, 1989; Iglesias & Preiss, 1992); Ballicora et al., 2003). Esta amplia especificidad que presenta, indica que la enzima responde a metabolitos provenientes de diferentes vías metabólicas, los cuales actúan como indicadores de la presencia de un exceso de carbono en la célula.

Las bacterias fotótrofas anoxigénicas pertenecientes al grupo representado por *Rhodospirillum rubrum*, utilizan intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como fuente de carbono, pero no utilizan glucosa para tal fin. En particular, utilizan ácido succínico y malato para transformarlos en piruvato vía oxaloacetato. Además utilizan dióxido de carbono por carboxilación directa del acetato (ciclo reductivo de los ácidos carboxílicos (Preiss J, 1989) para formar piruvato. De este modo, estas bacterias pueden acumular glucógeno en condiciones anaeróbicas y fotosintéticas en presencia de intermediarios de la síntesis de piruvato. La mayoría del carbono se transforma en piruvato, siendo éste un indicador de la cantidad de carbono disponible. En estas bacterias la ADPGlc PPasa es activada solamente por piruvato y no es inhibida por compuestos de adenina, a diferencia de los dos grupos anteriormente mencionados (Preiss & Romeo, 1989; Iglesias & Preiss, 1992; Ballicora et al., 2003).

Los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica, tales como cianobacterias, plantas y algas verdes, utilizan el ciclo reductivo de las pentosas fosfato para fijar el CO₂. En tales organismos, el 3PGA, producto primario de la fijación de dióxido de carbono, es el principal activador de la ADPGlc PPasa mientras que el Pi es el principal inhibidor). Así, en los períodos de luz, cuando hay fotosíntesis, aumentan los niveles de 3PGA y disminuyen los niveles de Pi, a causa de la fotofosforilación. Por el contrario, durante la noche disminuyen los niveles de 3PGA y aumentan los niveles de Pi. Una alta relación 3PGA/Pi indica un estado de alta carga energética y fijación de carbono en el cloroplasto, favoreciendo la activación de la ADPGlc PPasa para que sintetice ADPGlc, el dador de grupos glucosilos necesario para la síntesis y acumulación de almidón (Sivak & Preiss, 1998; Preiss, 1991).

2. 2. 2. 2.- Importancia del extremo N-terminal en la regulación alostérica de las ADPGlc PPasas.

Se han realizado numerosos estudios a fin de identificar regiones en la ADPGlc PPasa, involucradas en la unión de los diferentes reguladores alostéricos (Haugen & Preiss, 1979; Gardiol & Preiss, 1990; Charng et al., 1994; Sheng et al., 1996; Meyer et al., 1998; Wu & Preiss, 1998). Estudios realizados en la ADPGlc PPasa de *E. coli*, demostraron que la región N-terminal era esencial para la activación de la enzima (Parsons & Preiss, 1978 a y b; Wu & Preiss, 1998). Además, trabajos realizados utilizando modificadores químicos, lograron identificar los sitios de unión de los activadores de las ADPGlc PPasas de *E. coli* y *Anabaena* PCC 7120. En dichos trabajos, se evaluó la respuesta de la enzima a los efectores, luego de modificar químicamente distintos residuos de lisina de la misma con piridoxal-fosfato (PLP). De esta manera, se localizaron regiones específicas en dichas enzimas para la unión de los activadores, inhibidores y sustratos. Además, se sugirió que los residuos de lisina en dichas regiones están involucrados en la unión de los respectivos efectores de estas enzimas (Haugen & Preiss, 1979; Charng et al., 1994). Posteriormente, estudios de mutagénesis sitio-dirigida demostraron la importancia que tienen estos residuos en la regulación alostérica de dichas enzimas. En este sentido, se identificaron residuos específicos de lisina (K) involucrados en la unión de los activadores a las enzimas de *E. coli* (K-39) y *Anabaena* PCC 7120, (K-384 y K-419) (Gardiol & Preiss, 1990; Charng et al., 1994; Charng et al., 1995; Sheng et al., 1996).

Por otra parte, estudios de modificación química con fenilglioxal-fosfato (PGO) revelaron la importancia de ciertos residuos de arginina (R) en la actividad y/o la regulación alostérica de las ADPGlc PPasas de *E. coli* (Carlson & Preiss, 1982), *Rhodobacter sphaeroides* (Meyer et al., 1999), *A. tumefaciens* (Gomez Casati et al., 2001) y cianobacterias (Iglesias et al., 1992; Sheng & Preiss, 1997). La sustitución de residuos de arginina por alanina mediante mutagénesis sitio-dirigida, permitió conocer los importantes y diversos roles desempeñados por las argininas de la región N-terminal de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* (Gomez Casati et al., 2001). En este sentido, se sugirió que las argininas 5 y 11 están involucradas en la activación por piruvato, aportando cargas positivas en esa región, facilitando así la unión de grupos carboxílicos (Gomez Casati et al., 2001). Asimismo, los datos obtenidos con la enzima mutada R32A sugirieron que la presencia de un residuo de arginina en la posición 32 es importante para que la enzima mantenga su afinidad por la Fru-6P. Por otra parte, los residuos de arginina 33 y 45 serían importantes para la activación de la enzima por Fru-6P, ya que las sustituciones de arginina por alanina en esas posiciones generan enzimas que son completamente insensibles a la activación por dicho efector.

Es importante destacar que los residuos de lisina y argininas anteriormente citados, en particular los relacionados con la activación de las ADPGlc PPasas de *E. coli* y *A. tumefaciens*, pertenecen a una región altamente conservada, denominada KRAKPAV (Figura 12) (Gardiol & Preiss, 1990; Meyer et al., 1998; Igarashi & Meyer, 2000; Gomez Casati et al., 2001). Se determinó que existe una relación entre la secuencia KRAKPAV y el tipo de activador de cada ADPGlc PPasa bacteriana (Figura 11). En este sentido, las ADPGlc PPasas de *A. tumefaciens* y *R. sphaeroides*, las cuales son activadas por Fru-6P y piruvato, tienen arginina en una posición particular de dicha región (R32). Por el contrario, en la posición equivalente de la enzima de *E. coli*, la cual es activada por Fru 1,6-bisP, se encuentra una lisina (K39, Figura 11). Por otra parte, las enzimas de *R. rubrum* (RESKPAV), *Bacillus stearothermophilus* (NLAKPAV) y *Anabaena* (LRAKPAV), las cuales no son activadas por azúcares

fosfato, carecen de residuos positivamente cargados en dicha región. A partir de estas observaciones, se postuló que el correcto posicionamiento de una alta concentración de cargas positivas en esa región N-terminal, favorece la unión de moléculas con grupos fosfato o carboxilo (Meyer et al., 1999).

Dado que aún no se conoce la estructura tridimensional de la ADPGlc PPasa, es importante destacar que estudios con modificadores químicos y mutagenesis sitio-dirigida de residuos específicos, relacionando la estructura y la función de dicha enzima, constituyen herramientas importantes para comprender los mecanismos moleculares de activación, que son claves para la regulación de la biosíntesis de glucógeno. En este sentido, la posibilidad de continuar y ampliar los mismos, permitiría comprender mejor del rol de los aminoácidos antedichos y el de otros que participen en la activación de la enzima.

Ag t	MSEKRVQPLARDAMAYVLAGGRGSRLKELTDFRAKPAVYFGGKARIIDFALSNALNSGIRRI
Rb s	MKAQPPLRRLTAQAMAFVLAGGRGSRLKELTDRAKPAVYFGGKARIIDFALSNAMNSGIRKMA
E co	MVSLEKNDHMLARQLPLKSVALILAGGRGTRLKDLTNKRAKPAVHFGGKFRIIDFALSNCINSGIRRMG
Sal ty	MVSLEKNDRVMLARQLPLKSVALILAGGRGTRLKDLANKRAKPAVHFGGKFRVIDFALSNCINSGIRRI
Rd r	DQITEFQOLDINRAKETLALVLAGGRGSRLDLTNRESKPAVPFGGKYRIIDFPLSNMNSGIRRM
Ana	MKKVLAIILGGGAGTRLYPLTKLRKPAVPVAGKYRLIDI PVSNCINSEIFKIY
Cons	A LAGGRG RL LT RAKPAV FGGK R IDF LSN

REFERENCIAS: Ag t: *Agrobacterium tumefaciens*; Rb s: *Rhodobacter sphaeroides*; E co: *Escherichia coli*; Sal ty: *Salmonella typhimurium*; Rd r: *Rhodospirillum rubrum*; Ana: *Anabaena*; Cons: secuencia consenso

Figura 12.- Secuencias aminoacídicas de la región N-terminal de ADPGlc PPasas de diferentes bacterias

El **Objetivo general** de este trabajo de tesis fue contribuir al conocimiento del metabolismo de polisacáridos en bacterias, poniendo especial énfasis en aspectos relacionados con el rol de dichos compuestos en la simbiosis mutualista establecida entre rizobios y leguminosas, proceso éste de gran importancia ecológica y agronómica. Los estudios realizados se refirieron principalmente a rizobios que son simbioses de especies del género *Lotus*, las cuales son de gran importancia para la producción de forraje en la Pampa Deprimida del Salado, el sitio geográfico donde se encuentra la institución en la que se realizó este trabajo.

Una parte del trabajo estuvo orientada a conocer los mecanismos de síntesis y la estructura de glucanos cíclicos del género *Bradyrhizobium*. Y a determinar el tipo de glucano que producen cepas del género *Mesorhizobium*. También se evaluó si existe una relación entre el tipo de glucano que producen los rizobios antes analizados y la capacidad de formar nódulos efectivos en distintas especies de *Lotus*. En este sentido, los **objetivos particulares** que se plantearon fueron los siguientes:

1.- Caracterizar la estructura química de los glucanos cíclicos acumulados por la cepa de crecimiento lento de *B. loti* NZP 2309. Comparar dicha estructura con la de los glucanos cíclicos producidos por *B. japonicum* USDA 110.

2.- Estudiar la síntesis *in vitro* de los glucanos cíclicos de *B. loti* NZP 2309.

3.- Identificar el tipo glucano cíclico que producen las cepas de *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037.

4.- Evaluar si existe una relación entre el tipo de glucano producido por las cepas de *M. loti* y *B. loti* y la capacidad de formar nódulos efectivos en especies de *Lotus*.

Otra parte del trabajo contempló aspectos relacionados con la síntesis de glucógeno en rizobios y la organización de los genes responsables de dicho proceso. En relación con este tema, se plantearon los siguientes **objetivos particulares**:

1- Estudiar la organización y la secuencia de los genes de *Bradyrhizobium loti* que participan en la síntesis de glucógeno, y comparar los mismos con los de otros rizobios.

2- Identificar los reguladores alostéricos de la ADPGlc PPasa de *B. loti*. Determinar el contenido relativo de la enzima bacteriana y vegetal en nódulos.

3- Determinar el rol regulatorio que desempeñan los residuos de arginina localizados en la región altamente conservada de las ADPGlc PPasas (región RRAKPAV), utilizando como modelo experimental la enzima de *A. tumefaciens*.

CAPÍTULO I. BIOSÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GLUCANOS CÍCLICOS EN RIZOBIOS QUE ESTABLECEN SIMBIOSIS CON ESPECIES DEL GÉNERO *LOTUS*.

INTRODUCCION

El estudio y caracterización de los glucanos cíclicos en diferentes especies del grupo α y β de proteobacterias ha sugerido que las especies de rizobios de crecimiento rápido producen glucanos cíclicos con uniones $\beta(1-2)$ mientras que las especies de crecimiento lento producen glucanos cíclicos con enlaces $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (Breedveld & Miller, 1994).

Evidencias experimentales demostraron que los glucanos cíclicos desempeñan un rol importante durante la nodulación, particularmente en la etapa de infección (Breedveld & Miller, 1994). Como toda interacción bacteria-planta, la naturaleza del rizobio y de la leguminosa es importante para una nodulación eficiente. En *S. meliloti*, la capacidad de producir glucanos $\beta(1-2)$ cíclicos, es fundamental para una simbiosis efectiva (Dylan et al., 1986). En este sentido, mutantes en la síntesis y transporte de glucanos cíclicos tienen alterada su capacidad de formar nódulos efectivos en sus hospedantes naturales (Bredveld & Miller, 1994). Sin embargo, el efecto de tales mutaciones sobre la nodulación puede ser diferente dependiendo de la dupla rizobio-leguminosa. Se ha descrito, en *S. fredii*, una cepa mutada en la síntesis de glucanos $\beta(1-2)$ cíclicos que no tiene afectada la formación de nódulos efectivos en los cultivares de soja Mc Call y Peking (Iñón de Iannino et al., 1996). Por otra parte, en los rizobios de crecimiento lento, que sintetizan glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ cíclicos, la producción de este polisacárido es fundamental para la correcta invasión del nódulo (Dunlap et al., 1996). Mutantes que no producen este polisacárido, o acumulan un glucano con una estructura química modificada, son incapaces de formar nódulos efectivos (Bhagwat & Keister, 1995; Bhagwat et al., 1996).

Por otra parte, se ha sugerido que los glucanos cíclicos pueden ser transportadores de otras moléculas señal dentro de los tejidos de la planta, debido a su capacidad para formar complejos de inclusión y favorecer la solubilización de flavonoides derivados de leguminosas (Spaink, 2000). Otros estudios sugieren que los glucanos cíclicos permiten la adhesión de los rizobios a las células de la planta (Breedveld & Miller, 1994) y suprimen las respuestas de defensa del hospedante (Bhagwat et al., 1999).

Si bien la síntesis de los glucanos cíclicos y el rol de los mismos han sido bien estudiados en numerosas interacciones rizobio-leguminosa, el modelo rizobio-*Lotus* spp ha sido poco explorado. El único antecedente hasta el presente, es el estudio de la síntesis de los glucanos cíclicos en una cepa aislada de nódulos en *L. glaber*, que presuntamente pertenece al género *Mesorhizobium* (Lepek et al., 1990). Las especies de *Lotus* establecen simbiosis con rizobios de los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*. El género *Mesorhizobium* está formado por especies que tienen características filogenéticas intermedias entre los géneros *Bradyrhizobium* y los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Jarvis et al., 1997). Una de las características distintivas es su velocidad de crecimiento, que oscila entre los 3 a 7 días en agar-manitol levadura, a 28°C (Jarvis et al., 1997) y puede ser similar a la velocidad de crecimiento de especies de *Bradyrhizobium* (Young, 1996).

Al comienzo del trabajo de tesis no existía información con respecto al tipo de glucano y a los mecanismos de síntesis de los mismos en cepas de *Bradyrhizobium* capaces de nodular *Lotus* spp. Tampoco había información alguna respecto al tipo de glucanos presentes en distintas cepas de *M. loti* de

colección, en relación con su capacidad de infectar distintas especies de *Lotus* spp.

Teniendo en cuenta la importancia de los glucanos cíclicos en el establecimiento de la simbiosis efectiva entre leguminosas y rizobios y la relevancia agronómica de la simbiosis *Lotus* spp-rizobio, resulta evidente que el estudio de la síntesis de glucanos en simbiosis de *Lotus* merece ser estudiada, dado que podrían existir diferencias en el tipo de glucanos que producen dichas cepas, que se relacionen con la capacidad de formar nódulos efectivos en distintas especies de *Lotus*.

Por otra parte, se ha demostrado que los glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ sintetizados por la cepa lenta *B. japonicum* USDA 110, pueden bloquear mecanismos de defensa de plantas de soja, asociados con la síntesis de flavonoides (Mithöfer et al., 1996). Se ha destacado la importancia que tiene el tipo de enlace y la estructura de estos glucanos para la actividad supresora (Bhagwat et al., 1999) y para la correcta invasión de los nódulos (Bhagwat et al., 1996).

Teniendo en cuenta la directa relación que existe entre la estructura y la función de estos polisacáridos, resulta relevante determinar la estructura de los glucanos cíclicos producidos por otras especies de *Bradyrhizobium*, para establecer el grado de conservación de la estructura de los mismos en cepas lentas. En particular nos interesó determinar la estructura de los glucanos producidos por la cepa lenta que nodula especies de *Lotus* y comparar dicha estructura con la de los glucanos producidos por *B. japonicum*, los cuales han sido estudiados previamente (Rolin et al., 1992).

Por otra parte, dada las características de crecimiento intermedio que presentan las bacterias del género *Mesorhizobium*, nos propusimos determinar y comparar el tipo de glucano que sintetizan y acumulan dos cepas de colección de *M. loti* y evaluar si la estructura de los mismos está relacionada con la capacidad que tienen dichas cepas para nodular distintas especies de *Lotus*.

MATERIALES Y METODOS

MM. 1.- Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas de colección *B. loti* NZP 2309, *M. loti* NZP 2037 y *M. loti* NZP 2213, *B. japonicum* 110 y *A. tumefaciens* 348. Las cepas *B. loti* NZP 2309, *M. loti* NZP2037 y *M. loti* NZP 2213 fueron cedidas por el Dr. Steven Pueppke del Departamento de Patología Vegetal, Universidad de Missouri, Columbia, MO, USA. Las cepas *B. japonicum* USDA 110 y *A. tumefaciens* 348 fueron cedidas por el Dr. Peter Beuselinck de la colección de cultivos de *Rhizobium* del Departamento de Agricultura de Beltsville, MD, USA.

MM. 2.- Condiciones de cultivo

Las cepas de rizobios se cultivaron en medio AMA a pH=7, con agitación, a 28°C y la cepa de *A. tumefaciens* se cultivó en medio TY, a 30°C. En todos los casos los cultivos se inocularon con una relación inóculo: cultivo de 1:100 y se cultivaron con agitación (200 rpm) durante distintos tiempos. Los cultivos de *A. tumefaciens* y *M. loti* se cosecharon luego de dos y tres días de incubación respectivamente. Este período se prolongó hasta cinco días para las cepas de *Bradyrhizobium*. Los medios fueron suplementados con 15 g/l de agar cuando se los usó para repicar las distintas cepas en placas de Petri y picos de flauta, para determinar la pureza de los cultivos y para su mantenimiento durante plazos cortos de 3 meses respectivamente.

MM. 3.- Medios de cultivo utilizados

AMA: 0,5 g/l de K₂HPO₄; 0,2 g/l de MgSO₄·7H₂O; 0,2 g/l de NaCl; 1 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de manitol

TY: Extracto de levadura 3 g/l, triptona 5 g/l

MM. 4.- Extracción de glucanos asociados a células

Para extracciones con fines analíticos se cosecharon células en fase exponencial tardía a partir de 100 ml de cultivos de *B. loti* NZP 2309, *M. loti* NZP 2213 y *M. loti* NZP 2037. Para extraer polisacáridos celulares, los precipitados se resuspendieron en una solución 1% (p/v) de TCA y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente de acuerdo al método descrito por Iñón de Iannino y Ugalde (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). Posteriormente, los extractos de TCA se neutralizaron con amoníaco, se llevaron a sequedad por evaporación y se resuspendieron en agua bidestilada. Para extracciones de glucanos con propósitos preparativos, se utilizaron 20 l de cultivo y los precipitados obtenidos luego de cosechar las células de *B. loti* NZP2309, se extrajeron a temperatura ambiente con una solución 2 % (p/v) de TCA y luego con una solución 10% (p/v) de TCA. Los extractos celulares se neutralizaron con amoníaco, se llevaron a sequedad por evaporación y se resuspendieron en agua bidestilada para su posterior análisis.

MM. 5.- Caracterización de glucanos asociados a células

Los extractos con fines preparativos, obtenidos como se indicó anteriormente, fueron filtrados por columnas de *Bio-Gel P4* (2 cm x 90 cm). Los compuestos se eluyeron de la columna con una solución 15% (v/v) de ácido acético, se recogieron fracciones de 3 ml y los carbohidratos en cada una de las

fracciones se detectaron por el método de antrona-sulfúrico (Dische, 1962). Con el objeto de tener buenas resoluciones y no sobrecargar las columnas, se sembraron como máximo 10 mg de equivalentes de glucosa en la columna. La columna pudo resolver 6 muestras principales que se numeraron correlativamente de acuerdo al sentido inverso del volumen respectivo de elusión. En cada filtración molecular, las muestras que eluyeron con K_{av} similares, medidos por antrona-sulfúrico (Dische, 1962), se juntaron y posteriormente fueron liofilizadas.

El coeficiente de partición K_{av} , se calculó como $(V_e - V_o)/(V_t - V_o)$ donde V_e es el volumen de elusión del compuesto. V_o es el volumen muerto y V_t es el volumen total de la columna.

Los extractos preparados con fines analíticos, se filtraron por columnas de *Bio-Gel P4* (1,5 cm x 86 cm) y se eluyeron con una solución 0,1 M de acetato de piridina (pH 5,5), (Iñón de Iannino & Ugalde, 1989) y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Al igual que en el caso anterior, los carbohidratos se detectaron por el método de antrona-sulfúrico (Dische, 1962).

MM. 6.- Preparación de membranas internas

Se cosecharon cultivos de 1 l de cada una de las cepas antes mencionadas. Los precipitados de las cepas de crecimiento lento fueron resuspendidos en 200 ml de una solución conteniendo 30 mM Tris-HCl (pH 8,0), con 0,5 M de NaCl y la cápsula de las bacterias se removió por agitación con un *Omnimixer*. Las células descapsuladas se lavaron dos o tres veces con una solución 30 mM Tris-HCl (pH 8,0) para eliminar la cápsula y el NaCl. Todas las etapas se realizaron en frío.

Las membranas internas se prepararon de acuerdo al método de Osborn & Munson (Osborn & Munson, 1984) con pequeñas modificaciones. En todos los casos, las células se resuspendieron en 10 ml de una solución 30 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20% (p/v) sacarosa, 10 mM EDTA (2 ml de la solución por cada g de precipitado de células). Luego de resuspender las células se agregó lisozima (Sigma) hasta una concentración final de 200 μ g/ml y la suspensión celular se mantuvo a 4°C durante 45 min. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm en rotor SS34 (3000 x g). El precipitado celular se resuspendió en una solución 30 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20% (p/v) sacarosa, 3 mM EDTA, 20 mM $MgCl_2$ y 1 mg/ml de DNasa (de páncreas bovino, tipo IV, Sigma). Al resuspendido, se le agregó PMSF (fenil- metil- sulfonil- fluoruro) para alcanzar una concentración final de 2 mM. Para romper las células, se pasó la muestra por una prensa de French, sometiendo la suspensión celular a alta presión (18000 psi equivalente a 6 toneladas) y repitiendo el procedimiento tres veces. El extracto se centrifugó 15 min a 5000 rpm en rotor SS34 para eliminar las células que no se rompieron y el sobrenadante se utilizó para la obtención de las membranas internas y externas las cuales se separaron utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa (20, 44 y 55% p/v de sacarosa) por ultracentrifugación, a 23000 rpm en un rotor SW 40 durante 16 h. La banda correspondiente a cada una de las membranas se extrajo por succión, se diluyó mediante el agregado de 2 o 3 volúmenes de 30 mM Tris-HCl (pH 8,0), 3 mM EDTA y luego de homogeneizar la suspensión, las mismas se recuperaron por centrifugación a 45000 rpm por 3 h en un rotor 70 Ti. El precipitado obtenido se homogeneizó en un *potter* con 500 μ l de una solución 30 mM Tris-HCl (pH 8,0). Se midió la cantidad de proteínas por el método de Lowry y col. (Lowry et al., 1951) y se guardaron las membranas congeladas por varios meses a -20°C sin mayor pérdida de la actividad. Todas las etapas fueron realizadas en frío y las soluciones en todos los casos se conservaron en baño de hielo.

MM. 7.- Síntesis *in vitro* de glucanos

La síntesis *in vitro* de los glucanos se siguió con la estrategia de pulso y caza. Esto es, se da un pulso de sustrato marcado radioactivamente y luego se reemplaza por el mismo pero no marcado. Luego se caza (o se busca) la distribución de la marca radioactiva en el producto formado.. Los experimentos se realizaron en un volumen final de 50 μ l, que contenía 5 μ l del homogenato de membranas internas o externas (200 μ g. de proteína), UDP-[14 C]Glc (90000 cpm; 10,5 Gbq/mmol), 10 mM $MgCl_2$ y 50 mM Tris-HCl (pH 8,2). La mezcla de reacción se incubó a 10, 20 o 30°C según el experimento. Cuando fue necesario, en los experimentos de pulso y caza, se agregó Glc no radioactiva (2 mM concentración final) y la incubación continuó por 30 min más. La reacción se detuvo dependiendo del experimento, por los siguientes métodos:

a) Se agregaron 300 μ l de agua, se agitó y la mezcla se calentó durante 1 min a 100°C. Luego de enfriar 5 min en hielo, se centrifugó a 5000 x g durante 5 min. Los sobrenadantes se sometieron a cromatografías en columnas de *DEAE-Sephadex* (Zorreguieta & Ugalde, 1986) y los precipitados se resuspendieron en 1 ml de 10% (p/v) de TCA y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio para determinar incorporación de radioactividad en los productos insolubles, según el método descrito por Zorreguieta y Ugalde (Zorreguieta & Ugalde, 1986). Los compuestos radioactivos que eluyeron de columnas de *DEAE-Sephadex* (fracción soluble) se filtraron en columnas de *Bio-Gel P4* y se eluyeron con agua bidestilada de acuerdo al método descrito por Iñón de Iannino y Ugalde (Iñón de Iannino & Ugalde, 1989).

b) Se agregó 1 ml de 10% (p/v) de TCA, se enfrió durante 5 min y se centrifugó durante 10 min a 5000 x g. La fracción insoluble se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS como se describió previamente (Briones et al., 1997). Las proteínas se tiñeron con *Coomassie Blue* y la radioactividad se detectó por fluorografía como se describió previamente (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). Para la caracterización de los glucanos sintetizados *in vitro*, la síntesis se realizó a 30°C durante 30 min y la reacción se detuvo por el método A. Cuando no se requirió la caracterización de los glucanos, se utilizó el método B para inactivar la reacción.

MM. 8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida utilizando las condiciones y los sistemas descritos previamente (Briones et al., 1997). Los precipitados de 10% (p/v) de TCA (200 μ g de proteína aproximadamente) se resuspendieron en 30 μ l de una mezcla que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% (p/v) β -mercaptoetanol, 8 M urea, 2% (p/v) SDS y azul de bromofenol. Se neutralizaron los restos de TCA utilizando una solución 2 N de NaOH hasta el viraje del indicador al azul. Las muestras se calentaron durante 3 min a 100°C hasta su completa disolución.

MM. 9.- TRATAMIENTOS QUÍMICOS

MM. 9. 1.- Hidrólisis ácida total

La hidrólisis se hizo en una solución 1N de HCl en un volumen final de 300 μ l y en tubo cerrado. El tubo se mantuvo a 100°C en un baño de agua a ebullición durante 4 h. El HCl se eliminó por evaporación por corriente de aire hasta sequedad, con tres agregados sucesivos de 200 μ l de agua. Los productos de hidrólisis total se resuspendieron en un volumen de 50 μ l y se sembraron en papel. El cromatograma se desarrolló con el solvente A (MM. 10.).

MM. 9. 2.- Hidrólisis ácida parcial

La hidrólisis ácida parcial se hizo con una solución 0,5 N de HCl en un volumen final de 300 µl y se mantuvo a 100°C en un baño de agua a ebullición durante 20 min. El HCl se eliminó como en el caso anterior y los productos de hidrólisis se sembraron en papel. El cromatograma en papel se desarrolló con el solvente B (MM. 10).

MM. 9. 3.- Hidrólisis alcalina

Los glucanos que eluyeron con NaCl de una columna de *DEAE-Sephadex-A-25* se hidrolizaron con una solución 0,5 M de NaOH a 100°C durante 80 min. Este tratamiento libera residuos de fosfoglicerol que pueden estar unidos a los glucanos (Kennedy et al., 1976). Los glucanos sometidos a dicho tratamiento se sembraron posteriormente en una columna de *DEAE-Sephadex-A-25*.

MM. 10.- Cromatografías y electroforesis

Las cromatografías descendentes en papel fueron desarrolladas sobre papel Whatman N°1 (Whatman Inc., Clifton, NJ) con los siguientes solventes: Solvente A: 1-butanol/piridina/agua (6:4:3) v/v (Jeanes et al., 1951). Solvente B: isopropanol/acético/agua (27:4:9) v/v (Tung & Nordin, 1968).

Las electroforesis en papel se desarrollaron durante dos horas a 20 V/cm. Se utilizaron tiras de papel de 60 cm x 19 cm. Los papeles se embebieron con el solvente de corrida y se sumergieron en líquido refrigerante (tetracloruro de carbono).

Solvente C: molibdato de sodio 20 g/l (pH 5,0) (Bourne et al., 1951).

Solvente D: borato de sodio 50 mM (pH 9,2) (Foster, 1957).

Los carbohidratos fueron detectados por el método de plata alcalina (Trevelyan et al., 1950). La radioactividad fue detectada con un radiocromatógrafo Scanner Model 7201 (Packard).

MM. 10. 1.- Cromatografía en capa delgada (TLC)

Cultivos de 10 ml se centrifugaron a 3000 rpm en rotor GSA y las células cosechadas se resuspendieron en 300 µl de etanol 70% (v/v) y se incubaron durante 1 h a 37°C para extraer los glucanos celulares. Los mismos se resolvieron en placas de *Sílica-Gel-60* (Merck), utilizando la mezcla de solventes butanol/etanol/agua en una proporción 5:5:4, tal como describió Briones y col. (Briones et al., 1997). Los carbohidratos se detectaron pulverizando la placa con ácido sulfúrico 5% (v/v) en etanol y luego calentando durante 5 min a 120°C.

MM. 10. 2.- Cromatografía en columna de *DEAE-Sephadex*

Las distintas fracciones recolectadas de la columna de *Bio-Gel P4* se llevaron a sequedad. El residuo se resuspendió en agua bidestilada, se sembró en una columna de *DEAE-Sephadex A25* (0,8 cm x 6 cm) y se eluyó con concentraciones crecientes de NaCl (0, 10, 50, 100, 200 y 500 mM), con un volumen de 6 ml c/u. Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se tomaron alícuotas de 200 µl de cada fracción eluida para la detección de carbohidratos por el método de antrona- sulfúrico (Dische, 1962).

MM. 10. 3.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los productos recogidos de la columna preparativa de *Bio-Gel P4*, (fracciones 35 a 42) se sembraron en una columna de HPLC C18 ODS2, (4mm x 25cm, Pharmacia). Luego de la siembra, la columna se lavó con 25 ml de agua miliQ. Posteriormente la columna se eluyó con 40 ml de metanol 20% (v/v). Los glucanos eluyeron en las fracciones 4 y 5 del metanol 20% (v/v). La velocidad de flujo fue 0,5 ml/min a temperatura ambiente y se colectaron fracciones de 1 ml.

MM. 10. 4.- Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución por detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

El método utilizado es similar al reportado previamente por Koizumi (Koizumi et al., 1988). HPAEC-PAD se realizó con el sistema *Dionex 4500*, Sunnyvale, CA) que incluye un detector de pulsos electroquímicos (PED; electrodo de oro) de acuerdo a las condiciones descritas por Pfeffer y col. (Pfeffer et al., 1996).

MM. 11.- Reducción con borohidruro de sodio

Esta reacción se utilizó para establecer si los glucanos sintetizados *in vitro* tenían extremo reductor libre. Los polisacáridos se resuspendieron en 300 µl de agua bidestilada, se agregaron 8 mg de NaBH₄ y la mezcla se incubó durante toda la noche en oscuridad. Para remover el sodio, se agregó un exceso de resina *Dowex 50 W-X8* (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) y los carbohidratos se recuperaron luego de sucesivos lavados de la resina con agua. La muestra se llevó a sequedad varias veces y luego se agregó metanol para remover el ácido bórico como borato de metilo, mediante la evaporación del mismo. Los carbohidratos reducidos se hidrolizaron totalmente en una solución 1 M de HCl durante 4 h a 100°C y posteriormente el HCl fue removido por sucesivas evaporaciones. Los productos de la hidrólisis se sometieron a una electroforesis en papel en una solución de molibdato de sodio 2% (p/v) (pH 5,0), durante 2 h a 15V/cm (Bourne et al., 1961). Los diferentes productos en el papel se detectaron por medida de radioactividad.

En las cromatografías y en la electroforesis en papel además de utilizar los estándares internos glucosa y sorbitol, se incluyó como patrón muestras de glucano cíclico β(1-3), β(1-6) de *B. japonicum* USDA 110 tratadas en las mismas condiciones que las muestras de *B. loti*. Los estándares internos se revelaron por el método de plata alcalina (Trevelyan et al., 1950).

MM. 12.- Degradación de Smith

Este procedimiento se basa en la resistencia a la oxidación con periodato de sodio que en este caso tienen los polisacáridos, que depende del tipo de enlace que formen los residuos de glucosa. En este sentido, en algunos polímeros de glucosa con determinado tipo de enlace, quedan hidroxilos vecinales libres, los cuales son fácilmente oxidados mientras que en los polímeros que tienen otro tipo de enlaces glucosídicos, no quedan disponibles hidroxilos contiguos libres que puedan ser oxidados. De este modo, la capacidad de oxidación de azúcares se utiliza para establecer el tipo de enlace en el polisacárido.

Los carbohidratos se oxidaron mediante la incubación de los mismos en una solución 0,04 M de periodato de sodio durante 3 días en oscuridad. El exceso de periodato fue removido con 10 µl de etilenglicol y luego de incubación por 2 h, se agregaron 8 mg de borohidruro de sodio. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 16 h a temperatura ambiente. Luego se agregó una solución 10% (p/v) de ácido acético para remover el exceso de borohidruro de sodio. Las muestras se sembraron en una columna de *Bio-Gel P2* para remover

las sales. Las muestras desaladas se hidrolizaron parcialmente tal como se describió anteriormente. El HCl se removió por evaporación y las muestras se sembraron nuevamente en una columna de *Bio-Gel P2*.

MM. 13.- Digestión con laminarinasa

Las muestras se incubaron a 37°C con 20 µg de 5,7 U/mg de laminarinasa (Sigma, EC 3.2.1.6) en una solución 50 mM de acetato de sodio (pH 5,0).

MM. 14.- Dosaje de carbohidratos

Los carbohidratos de las muestras se midieron por el método de antrona-sulfúrico (Disch, 1962). A una alícuota de 200 µl de las muestras se agregaron 400 µl de antrona-sulfúrico (200 mg de antrona en 100 ml de H₂SO₄). Se agitó vigorosamente y luego de 30 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 620 nm. La reacción es específica para carbohidratos, los cuales dan una coloración azul-verdosa característica. Las curvas de calibración se realizaron con un estándar de glucosa. La sensibilidad del método es de 10 a 100 µg/ml de carbohidrato.

MM. 15.- Espectroscopía de masa FAB

Los espectros de masa se obtuvieron con un espectrómetro de masa magnético VGZAB-2SE/FPD (VG Analytical, Manchester, UK). Las muestras se ionizaron por bombardeo rápido de átomos (FAB), a 8 kev usando una matriz de tioglicerol/ácido m-nitrobenzoico (MNBA) según lo previamente informado (Pfeffer et al., 1996).

El grado de polimerización (DP) de cada glucano lineal o cíclico detectado, se puede calcular de la siguiente manera:

La masa molecular esperada para una especie lineal con n residuos es:

$$(180 \times n) - [(n - 1) \times 18]$$

La masa molecular esperada para una especie cíclica con n residuos es:

$$(180 \times n) - (n \times 18)$$

En dichas fórmulas, el valor 180 corresponde a la masa molecular (PM) de la glucosa, 18 es el PM del agua y n es el número de residuos de glucosa en el polímero.

Teniendo en cuenta los valores de carga/masa obtenidos del espectro de masa FAB para cada glucano ionizado y comparando con las masas moleculares calculadas con las fórmulas antes mencionadas, se pudo determinar el grado de polimerización y el carácter cíclico o lineal de los mismos.

MM. 16.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)

Espectroscopía NMR de ¹H y ¹³C se realizó con un espectrómetro *Varian Unity plus 400*, Sugarland, TX a 35°C de acuerdo a las condiciones descritas por Pfeffer y col. (Pfeffer et al., 1996).

MM. 17.- ENSAYOS DE INTERACCION PLANTA-BACTERIA

MM. 17. 1.- Material vegetal.

Se utilizaron semillas de *L. glaber*, *L. pedunculatus* y *L. corniculatus* var. *hirsutus*; *G. max* cv Peking y *G. max* cv Mc Call (dos cultivares comerciales de soja); *Medicago sativa* L. y *Trifolium alexandrinum* L. Las semillas de *Lotus* se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado durante 15 min y luego se

enjuagaron varias veces con agua bidestilada estéril fría para eliminar el ácido remanente. Las semillas tratadas se dejaron en hidratación durante 24 h y posteriormente se transfirieron a placas de Petri con agar- agua para que germinaran en oscuridad en una cámara a 25°C. Las semillas de *G. max*, *M. sativa* y *T. alexandrinum*, se desinfectaron superficialmente con una solución de 0,1% (p/v) de hipoclorito de sodio durante 10 min y luego se lavaron sucesivas veces con agua bidestilada estéril. Las semillas desinfectadas se germinaron durante 24 a 48 h en placas de Petri con agar-agua a 25°C, en oscuridad. Para preparar los inóculos se utilizaron las cepas *B. loti* NZP 2309, *B. japonicum* USDA 110, *M. loti* NZP 2213 y *M. loti* NZP 2037. Las mismas se cultivaron en medio AMA, a 28°C con agitación a 150 rpm.

MM. 17. 2.- Ensayo de nodulación

Las plántulas de 3 días post-germinación de cada leguminosa se inocularon cada una con 0,2 ml de un cultivo del rizobio correspondiente, crecido en medio AMA hasta fase exponencial con D.O 0,8 medida a 600 nm o bien 0,2 ml de medio AMA para las plántulas no inoculadas utilizadas como control. Las mismas luego se trasplantaron a jarras de Leonard con vermiculita estéril y medio Jensen (Vincent, 1970) estéril, suplementado con 1 ml de una solución de oligoelementos por cada 1 l de Jensen (solución de oligoelementos: 0,04% p/v Bo; 0,05% p/v Mn; 0,005% p/v Zn; 0,005% p/v Mo; 0,002% p/v Cu). Las plántulas se crecieron durante el tiempo requerido por el ensayo en cuarto climatizado y se regaron con el mismo medio. Las plantas se incubaron en un cuarto climatizado a 25°C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, durante 6 semanas.

MM. 17. 3- Medición de actividad de nitrogenasa

La capacidad de fijar nitrógeno de los nódulos se determinó por reducción de acetileno a etileno (Wacek & Brill, 1976). Se utilizó el material del ensayo de nodulación.

Tubos de 50 ml con una planta cada uno se sellaron con tapas de goma y en cada uno se reemplazó 5 ml de aire por 5 ml de acetileno. Estos se incubaron en una cámara climatizada a 25°C durante 1 h. Se hicieron 10 repeticiones para cada cepa y para el control en los ensayos realizados con especies de *Lotus*, 3 repeticiones para los ensayos realizados con *G. max*. y 5 repeticiones para los ensayos con *M. sativa* y *T. alexandrinum*.

Se extrajeron muestras de 0,5 ml de cada tubo y se determinó la cantidad de etileno formado por cromatografía gaseosa. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890-A, equipado con una columna Poropack N y un detector de ionización de llama. Las condiciones de la corrida fueron: temperatura del horno = 30°C, temperatura del inyector= 80°C, temperatura del detector= 200°C, flujo de nitrógeno= 30 ml/min.

MM. 18.- MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

MM. 18. 1.- Purificación de ADN genómico

Se aisló ADN genómico de *B. loti* NZP 2309 y *B. japonicum* USDA 110 según el protocolo descrito por Wilson (Wilson, 1994). Se partió de 5 ml de un cultivo en fase exponencial, el cual se centrifugó durante 5 min a 11000 rpm en microcentrífuga, para obtener un precipitado. El mismo se resuspendió en 567 µl de una solución TE que contenía 50 mM Tris-Cl (pH:8), 10 mM EDTA. Se agregaron 30 µl de una solución 10% (p/v) de SDS y 3 µl de una solución 20

ug/ml de proteinasa K, se agitó e incubó durante 1 h a 37°C. Luego se agregó 100 µl de una solución 5 M de NaCl, se agitó vigorosamente, se adicionaron 100 µl de una solución 3% (p/v) de CTAB preparada en NaCl, se agitó y luego se incubó durante 10 min a 65 °C. Posteriormente se agregó igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1), se mezcló por inversión y se centrifugó 5 min a 14000 rpm. Se tomó la fase superior y se pasó a un tubo limpio, en el cual se agregó igual volumen de fenol: cloroformo-alcohol isoamílico (20:20), se agitó y se centrifugó 5 min a 14000 rpm. La fase superior se pasó a un tubo limpio, se agregó 5ul de una solución 10 mg/ml de RNAsa y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente se agregó igual volumen de isopropanol para precipitar el ADN. El precipitado se recuperó centrifugando 15 min a temperatura ambiente y descartando el isopropanol. Luego el ADN se lavó con 70% (v/v) de etanol, se centrifugó, se secó y se resuspendió en la solución TE.

MM. 18. 2.- Amplificación de ADN de rizobios a partir de secuencias repetitivas palindrómicas (rep) por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para identificar cada rizobio, se utilizó la técnica de amplificación por PCR del DNA bacteriano a partir de secuencias rep. Estas secuencias se encuentran ubicadas a lo largo del genoma y se han encontrado en una gran variedad de bacterias. La distancia entre dichas secuencias es lo que permite diferenciar una cepa de otra, dentro de cada especie. Se utilizaron los siguientes primers: primer REP 1R (5'- IIIICgICgICATCIGgC- 3') y REP 2I (5'-ICgICTTATCIGgCCTAC-3'). La mezcla de reacción para PCR (25 µl) contiene: 50pmol de cada primer; 50 ng de ADN molde; 1,25 mM de cada uno de los nucleótidos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Promega, Madison, Wisconsin); 2U de *Taq DNA polymerase* (Promega, Madison, Wisconsin); 10% de dimetilsulfoxido; 160ug/ml de albúmina bovina y *buffer* Gitchier 1x (de Bruijn et al. 1996). La reacción de amplificación se realizó en un ciclador Perkin-Elmer, con una etapa inicial de 7 min de desnaturalización a 95°C seguido por 35 ciclos, cada uno de los cuales se compone de una etapa de 1 min de desnaturalización a 94°C , 1 min de *annealing* a 40°C y 8 min de extensión a 65°C.

Una alícuota de 12 µl del producto de amplificación se analizó por electroforesis en un gel de agarosa preparado en una solución de TBE 0,5 x (TBE 50x: 0,45 M H₃BO₃-Tris; 10 mM EDTA) (de Bruijn et al. 1996) La agarosa se utilizó en una concentración de 1,6% (p/v), adicionada con 1 µg/ml de bromuro de etidio. Los fragmentos separados se visualizaron y posteriormente se fotografiaron bajo luz UV.

MM. 18. 3.- Amplificación del ADN ribosomal de 16S (16S rDNA) por PCR.

Se utilizaron los primers 27f (5'-GAGATTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'), que provienen de regiones conservadas de los genes de ARNr 16S bacterianos y pueden utilizarse para amplificar el gen de ADNr 16S completo de la mayoría de las bacterias (Grifoni et al., 1995). La amplificación se llevó a cabo con la mezcla de los siguientes reactivos: 50 µg de ADN templado purificado, *buffer* de reacción para la polimerasa conteniendo 10 mM Tris-Cl (pH 9,9), 50 mM KCl, 1% Triton X- 500, 1.5 mM MgCl₂; 20 µM de cada primer (27f y 1495r) y por último, 2U de *Taq DNA polymerase* (Promega, Madison, Wisconsin). La amplificación del ADN se llevó a cabo en un ciclador "Minicycler MJ research- Thermoblock, USA," utilizando el siguiente programa: etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 3 min; 35 ciclos, en los cuales cada ciclo tiene: 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de *annealing* a 56°C y 2

min de extensión a 72°C. Las bandas amplificadas se examinaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa preparado en TBE 0,5 x. La agarosa se utilizó en una concentración de 0,9 % (p/v), adicionada con 1 µg/ml de bromuro de etidio

MM. 18. 4.- Análisis de los fragmentos de restricción del ADNr 16S.

Los productos de la amplificación por PCR fueron digeridos con distintas enzimas de restricción (*Hinf*I, *Sau* 3A1, *Taq* I y *Hha* I, Promega) y los productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa preparado en una solución de TBE 0,5 x (Laguerre et al., 1994). Se utilizó un marcador de masa molecular (100 bp ladder (GIBCO BRL, Eggenstein, Germany)) para estimar el tamaño de los fragmentos separados. La agarosa se utilizó en una concentración de 2% (p/v), adicionada con 1 µg/ml de bromuro de etidio.

RESULTADOS

R. 1- CARACTERIZACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS GLUCANOS CICLICOS ACUMULADOS POR LA CEPA DE CRECIMIENTO LENTO DE *B. LOTI* NZP 2309. COMPARACION CON LA ESTRUCTURA DE LOS GLUCANOS CICLICOS PRODUCIDOS POR *B. JAPONICUM* USDA 110

R. 1. 1.- Separación de los glucanos acumulados *in vivo* en una columna de *Bio-Gel P4* preparativa.

Con el objeto de realizar un análisis estructural detallado de los glucanos celulares acumulados *in vivo* por la cepa NZP 2309, el precipitado bacteriano obtenido al centrifugar 20 l de cultivo, se extrajo en forma secuencial con una solución 2% (p/v) de TCA y luego con una solución 10% (p/v) de TCA. Para determinar si la calidad del material extraído por ambos tratamientos era similar, ambos extractos en forma separada, fueron sometidos a una separación por tamiz molecular, en una columna de *Bio-Gel P4* (sección MM. 5) (Figura 1. 1 A y B). Se detectaron seis muestras antrona-positivas, las cuales se numeraron correlativamente del 1 al 6 de acuerdo al criterio de tamaños moleculares relativos crecientes. El primer tratamiento con 2% (p/v) de TCA extrajo el 70% de los glucanos celulares (muestras 3 a 5, Figura 1. 1 A), mientras que el segundo tratamiento con 10% (p/v) de TCA liberó el 30% restante (muestras 3 a 5, Figura 1. 1 B). Si bien el perfil de elusión obtenido con ambos extractos fue similar, la proporción de las muestras fue diferente en cada caso. Los resultados demuestran que el tratamiento con 10% (p/v) de TCA es más eficaz para una extracción completa de los glucanos.

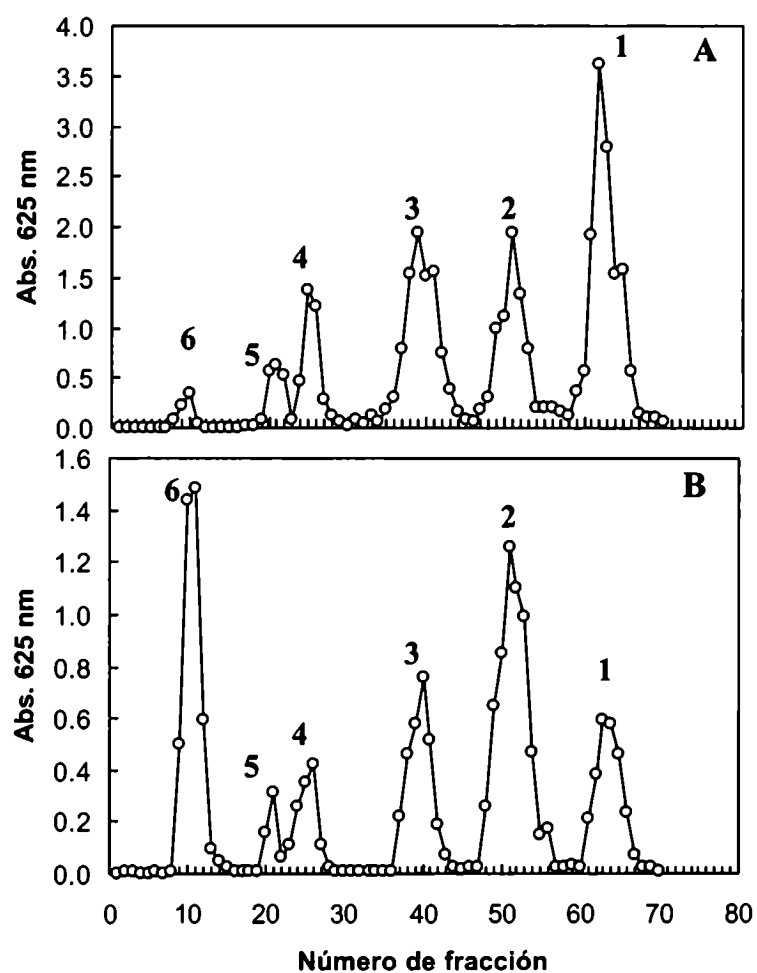


Figura 1. 1.- Separación de compuestos extraídos con TCA en una columna de *Bio-Gel P4* preparativa. A, 2% (p/v) de TCA. B, 10% (p/v) de TCA.

R. 1. 2.- Identificación del tipo de enlace que está formando los diferentes compuestos acumulados *in vivo* eluidos de la columna de *Bio-Gel P4*

Para comenzar nuestro estudio, se trató de determinar cuales de los compuestos separados por el tamiz molecular son glucanos. Para ello, se recolectaron las fracciones de cada una de las seis muestras obtenidas de ambas columnas (denominadas en adelante muestras 1 a 6) y se sometieron a una hidrólisis total y parcial (sección MM. 9. 1 y MM. 9. 2). Los productos de la hidrólisis total de la muestra 1 (fracciones 60 a 66) y de la muestra 2 (fracciones 48 a 52) se cromatografiaron según se describe en la sección MM. 9. 1. En ambas muestras se identificó glucosa como principal monosacárido y en menor proporción manosa y otro producto no identificado. Estos resultados indican que los compuestos identificados en ambas muestras, no son glucanos (Figura 1. 2). La hidrólisis total de las muestras 3 (fracciones 35 a 42), 4 (fracciones 23 a 25), 5 (fracciones 19 a 21) y 6 (fracciones 9 a 11), revelaron que los compuestos presentes tenían glucosa como único producto, sugiriendo que tales compuestos son glucanos (Figura 1. 3).

Posteriormente, para determinar el tipo de uniones que forman los residuos de glucosa, se realizó una hidrólisis parcial y una cromatografía en papel (sección MM. 9. 2) de las muestras 3, 4, 5 y 6. El perfil de los compuestos obtenidos fue similar en las 4 muestras analizadas, identificándose glucosa, genciobiosa, laminaribiosa y una serie de oligosacáridos con distinto grado de polimerización (Figura 1. 4). Estos resultados indican que los glucanos presentes en dichas muestras están formados principalmente por enlaces $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3)$ y además, que los mismos están estrechamente relacionados.

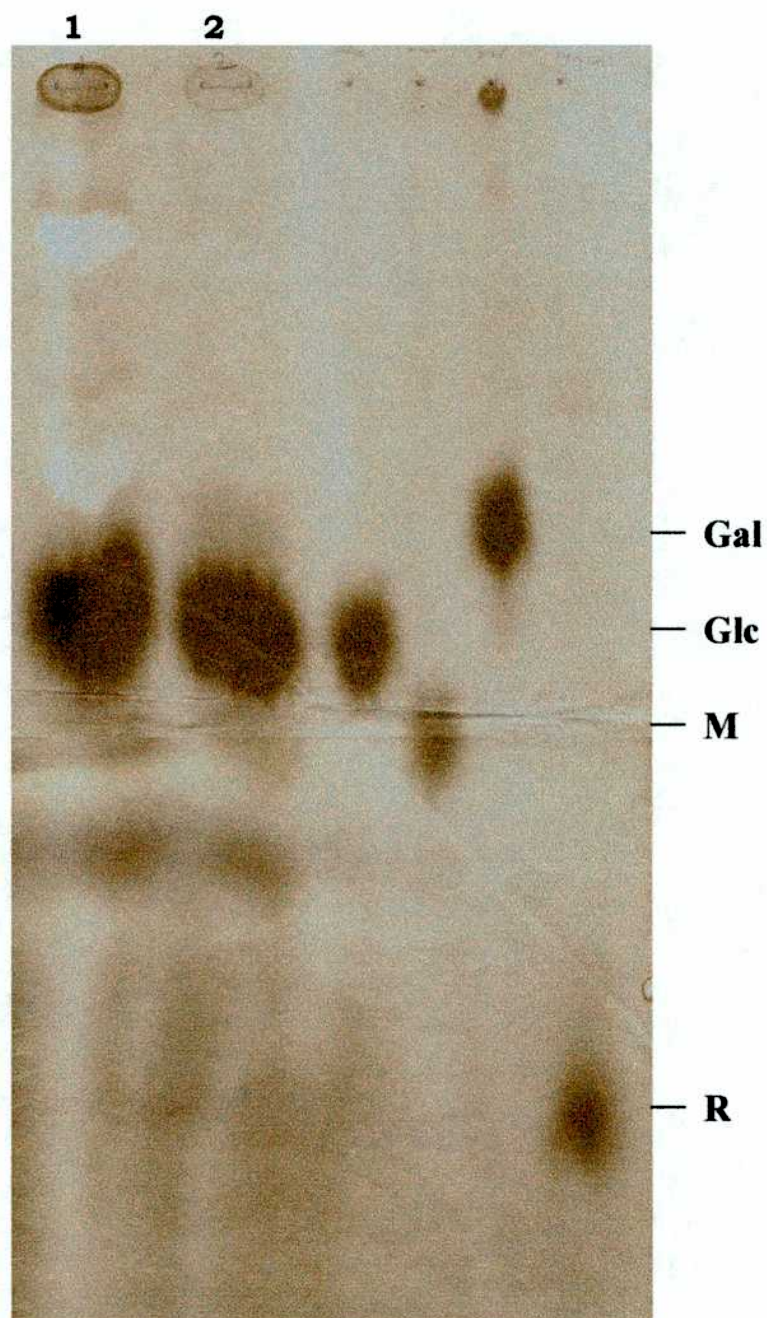


Figura 1. 2.- Cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis total de las muestras 1 y 2 de la cepa *B. loti* N2P 2309. Los productos de cada muestra se identificaron por comparación con estándares conocidos que se muestran a la derecha de la figura.. Glc, glucosa; M, manosa; Gal, galactosa; R, ramnosa

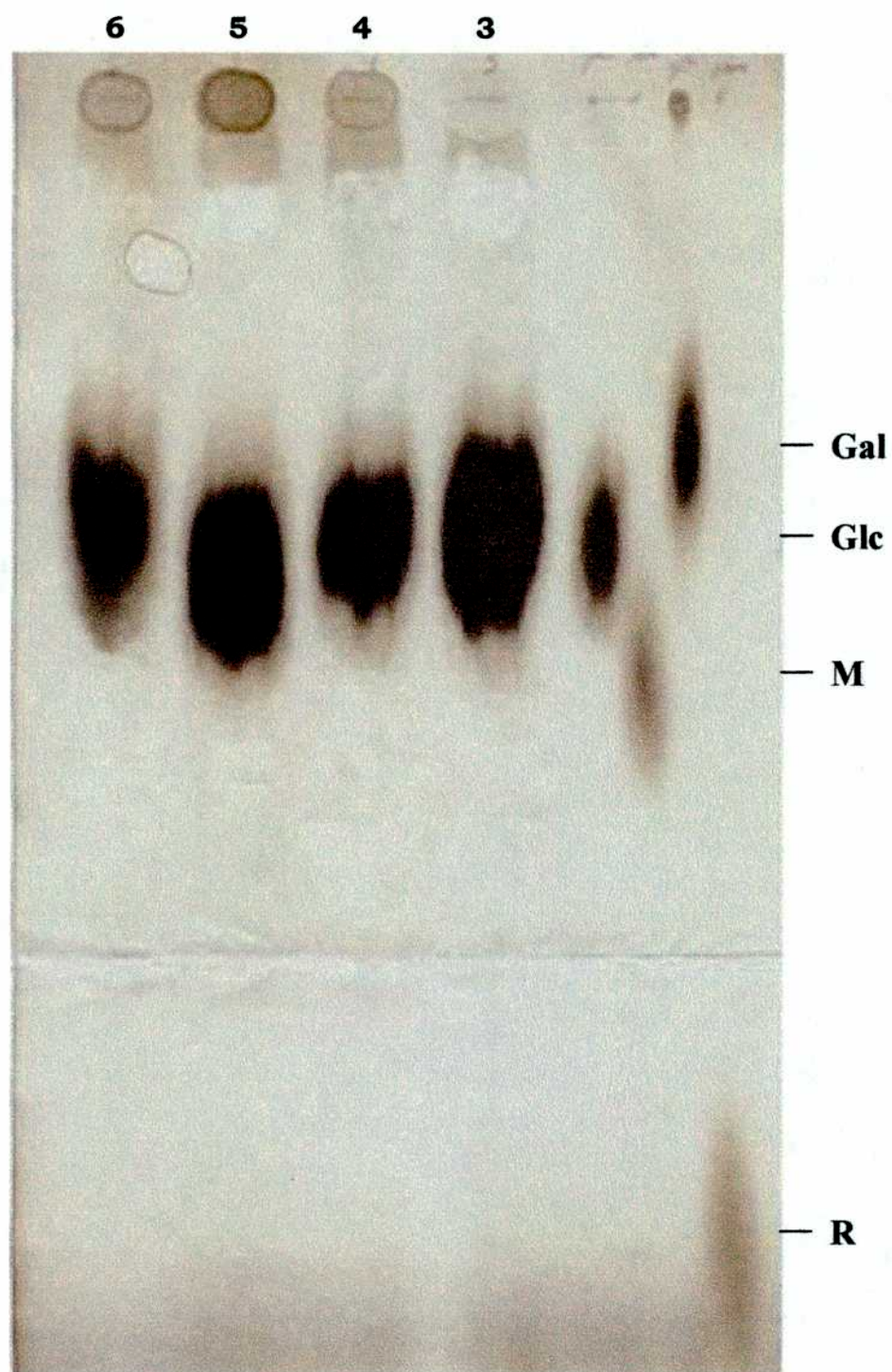


Figura 1. 3.- Cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis total de las muestras 6, 5, 4 y 3. Los productos de cada muestra se identificaron por comparación con estándares conocidos que se muestran a la derecha de la figura.. Glc, glucosa; M, manosa; Gal, galactosa; R, ramnosa



Figura 1. 4. - Cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis parcial de las muestras 3, 4 y 5. Los productos de cada muestra se identificaron por comparación con estándares conocidos A, soforosa; B, glucosa (Glc) y genciobiosa (Gen), C, laminaribiosa; D, isomaltosa; E, kogibiosa; F, celobiosa. Las flechas muestran oligosacáridos con distinto grado de polimerización.

R. 1. 3.- Determinación del grado de polimerización y estructura cíclica o lineal de los glucanos presentes en las muestras 3, 4 y 5, por espectroscopía de masa FAB

Para tener información precisa de la masa molecular de los glucanos acumulados por la cepa *B. loti* NZP 2309, las muestras 3, 4 y 5 recuperadas de ambas columnas de *Bio-Gel P4* se purificaron por HPLC (ver sección MM. 10. 3) y se sometieron a un análisis de espectroscopía de masa FAB (ver sección MM. 15). Los espectros de masa FAB determinaron la masa molecular de los distintos glucanos ionizados en las muestras 3, 4 y 5. De acuerdo a la masa molecular esperada para cada glucano lineal o cíclico con distinto grado de polimerización (DP), se pudo establecer si los glucanos presentes en dichas muestras eran cíclicos o lineales. En este sentido, se observó que la muestra 4 está formada por glucanos lineales de 14 residuos de glucosa ($M+1= 2286$) y la muestra 5 está formada principalmente por un glucano lineal con 13 residuos de glucosa ($M+1= 2124$) y en menor proporción por glucanos cíclicos con 16 residuos de glucosa ($M+1= 2593$) (datos no mostrados). Por otra parte, la muestra 3 está formada únicamente por especies cíclicas, de acuerdo a la masa molecular obtenida de sus formas ionizadas ($M+1= 1783$, $M+Na^+=1806$, $M+Na^+=1968$, $M+1=1622$, $M+Na^+=1644$). Se observó que la muestra 3 está formada por una fracción mayoritaria de glucanos con un DP de 11 residuos de glucosa (76%) y una fracción menor con glucanos que tienen un DP de 10 y de 12 (Figura 1. 5).

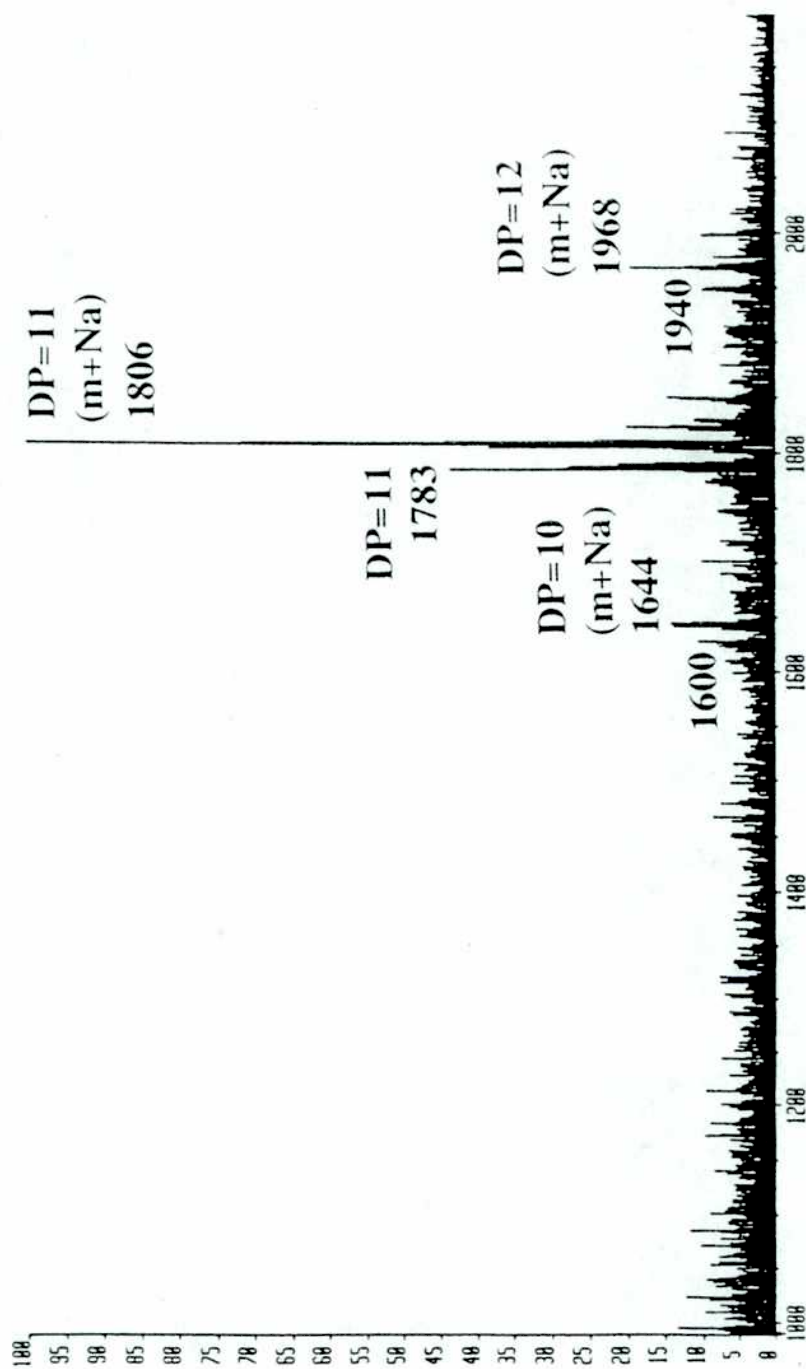


Figura 1. 5.- Espectro FAB masa de glucanos presentes en la muestra 3 de la cepa *B. loti*. El gráfico muestra la abundancia relativa de las distintas moléculas ionizadas. Los valores de las moléculas están dados por la relación masa/carga (m/z) de las mismas.

R. 1. 4.- Identificación de glucanos aniónicos en los productos acumulados *in vivo*

Las muestras 3, 4 y 5 que eluyeron de la columna de *Bio-Gel P4*, se sembraron en una columna de *DEAE-Sephadex A-25* y se eluyeron con distintas concentraciones de NaCl (ver sección MM. 10. 2) para determinar si dichos compuestos eran neutros o presentaban sustituyentes aniónicos. El perfil de elución de dichas muestras indica que los glucanos acumulados por la cepa *B. loti* NZP 2309 están formados por especies neutras ya que se detectó un único pico antrona-positivo (ver sección MM. 14), que eluyó de la columna con agua bidestilada. (Figura 1. 6).

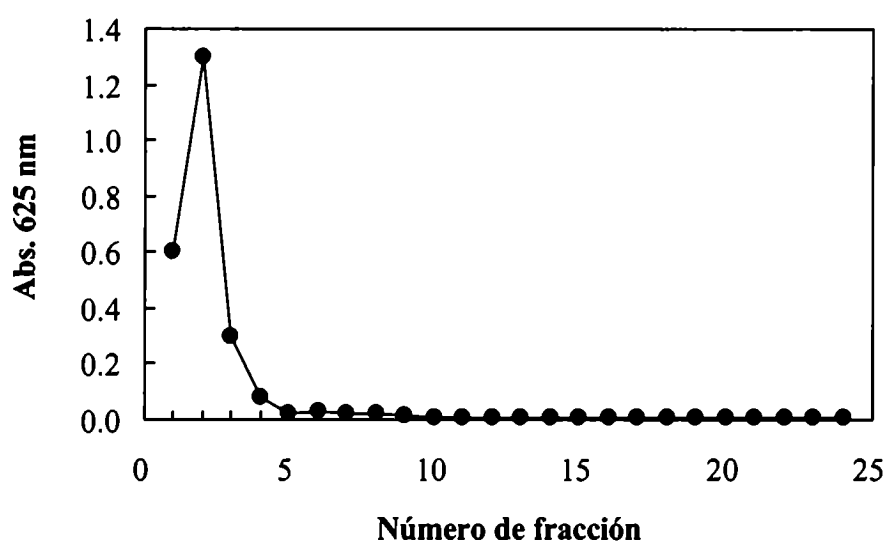


Figura 1. 6.- Perfil de elución de la muestra 3 en una columna de *DEAE-Sephadex A-25*. Los glucanos de dicha muestra eluyeron con agua bidestilada, como glucanos neutros. Resultados similares se observaron con las muestras 4,5 y 6 (datos no mostrados).

R. 1. 5.- Separación de los glucanos cíclicos presentes en la muestra 3 por Cromatografía de intercambio aniónico.

A partir de los resultados obtenidos por los espectros de FAB masa, se continuó solamente con el análisis de la muestra 3, que es la especie cíclica mayoritaria en *B. loti*. Con el objeto de comparar los glucanos cíclicos acumulados por las cepas lentas *B. loti* NZP 2309 y *B. japonicum* USDA 110, los glucanos de la muestra 3 de *B. loti* se sembraron y separaron por cromatografía de intercambio aniónico de alta performance con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), en una columna *Dionex* (sección MM. 10. 4). A su vez, se utilizaron las mismas condiciones para sembrar una alícuota de los glucanos acumulados por *B. japonicum*, los cuales habían sido previamente caracterizados por Rolin y col. (Rolin et al., 1992). Los perfiles obtenidos muestran que el principal glucano cíclico producido *in vivo* por la cepa NZP 2309 tiene un tiempo de retención menor que el compuesto principal producido por *B. japonicum* USDA 110 (Rolin et al., 1992) (Figura 1. 7). Las diferencias en los tiempos de retención están relacionadas con los diferentes grados de polimerización que presentan los glucanos de cada cepa, los cuales se determinaron previamente por estudios de espectroscopía de masa (Figura 1. 5 de esta tesis y trabajo de Rolin y col (Rolin et al., 1992). En este sentido se observó que el principal glucano cíclico acumulado por la cepa *B. loti* NZP2309 tiene 11 residuos de glucosa mientras que el principal glucano cíclico acumulado por la cepa *B. japonicum* USDA 110 está formado por 12 residuos de glucosa (Figura 1. 7).

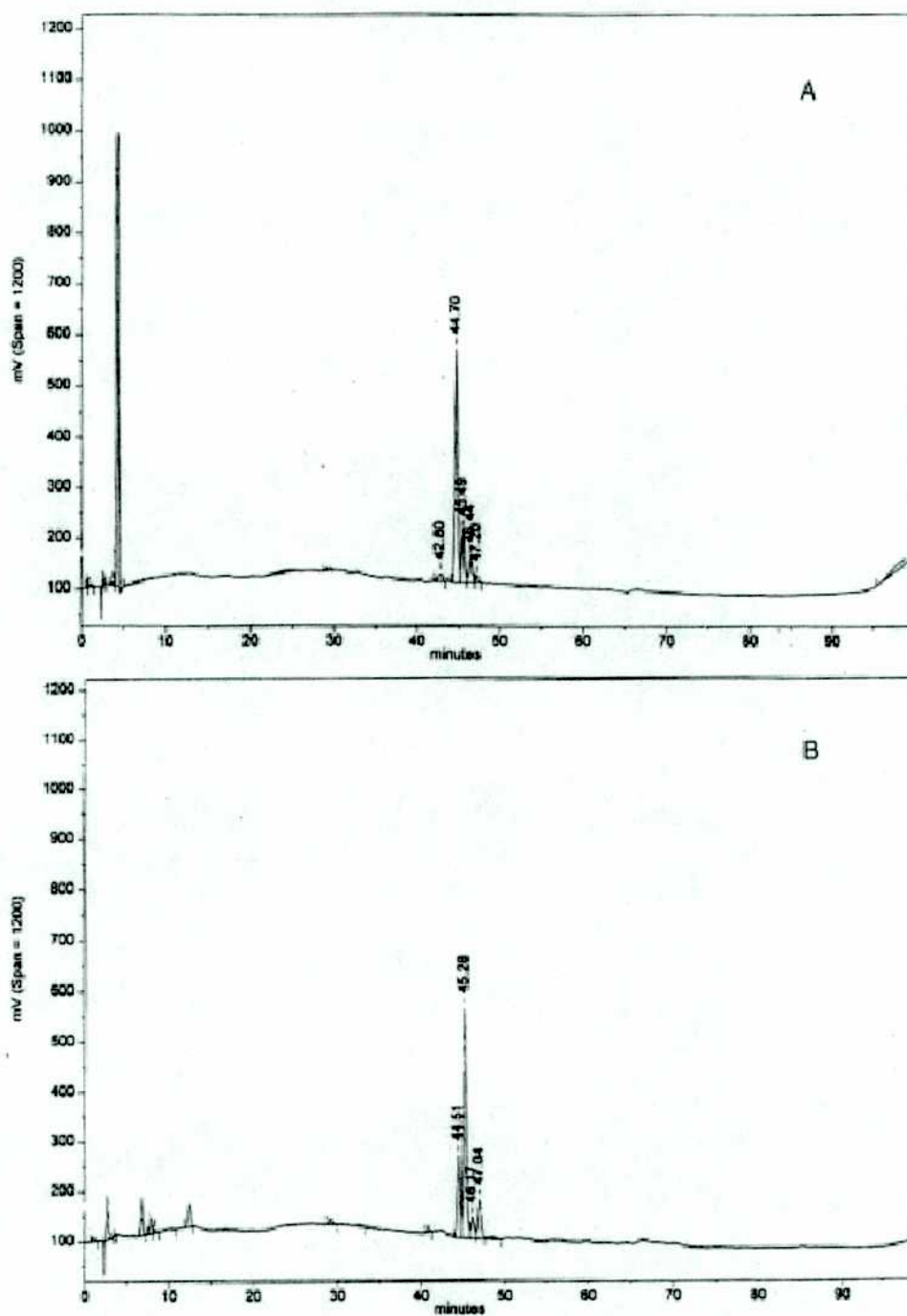


Figura 1. 7.- Perfil de glucanos cíclicos acumulados *in vivo*, separados por cromatografía de intercambio aniónico de alta performance con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) en una columna *Dionex*. A. especies cíclicas acumuladas por la cepa *B. loti* NZP 2309, B. especies cíclicas acumuladas por la cepa *B. japonicum* USDA 110.

R. 1. 6.- Identificación de la proporción de enlaces glucosídicos $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3)$ y presencia de ramificaciones en el principal glucano cíclico detectado en la muestra 3, por espectroscopía de RMN

La integración de los espectros de ^{13}C y ^1H en 1D reveló que los 11 carbonos anoméricos y protones están localizados a 103-104 y 4,42 – 4,83 ppm, respectivamente (Figura 1. 8). El espectro 2D HMQC demostró que el glucano cíclico compuesto por 11 residuos de glucosa, tiene una ramificación en la posición 6 del carbono presente en uno de los residuos de glucosa que forma parte del ciclo, a través de un enlace $\beta(1-3)$ (Figura 1. 8, Tabla 1.1). Además, se detectó que el ciclo está formado por enlaces $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3)$ en una relación 2 a 1 (excluyendo a la glucosa terminal y al residuo de glucosa que tiene un enlace $\beta(1-3-6)$) (Figura 1. 8, Tabla 1.1). Esta última glucosa está unida a dos residuos que forman parte del ciclo, por enlaces $\beta(1-3)$ y además está unida a una glucosa terminal de la rama por un enlace en el carbono 6.

El análisis posterior de esta estructura por NMR en dos dimensiones, en un experimento HMBC (sección MM. 16), estableció que esta molécula tiene un anillo de 10 glucosas con una glucosa terminal unida por un enlace $\beta(1-3)$ a uno de los átomos de carbono (C6) de un residuo de glucosa. Aunque se determinó que el anillo tiene 3 residuos de glucosa unidas por enlaces $\beta(1-3)$ y 6 glucosas unidas por enlaces $\beta(1-6)$, el ordenamiento de dichos residuos dentro del mismo no se pudo establecer.

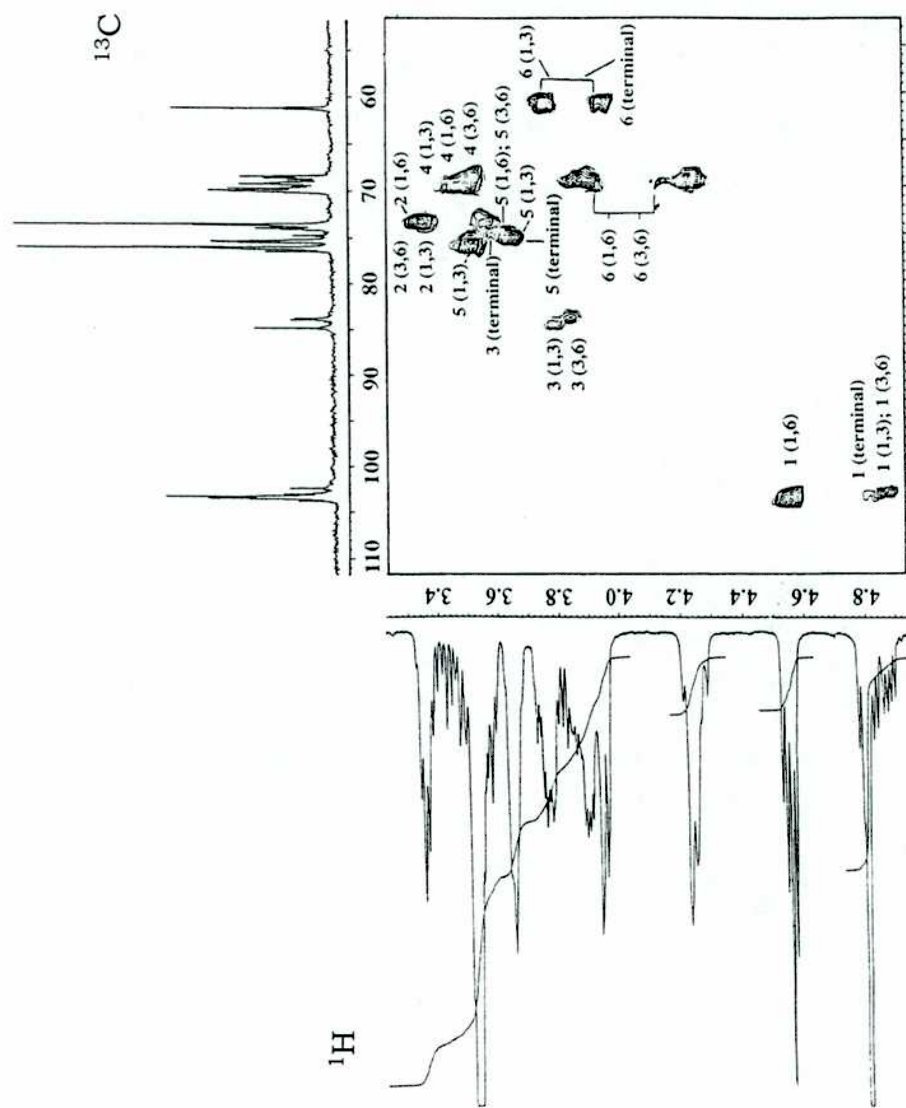


Figura 1. 8.- Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C en dos dimensiones (2D HMQC) de los glucanos cíclicos con DP= 11 de la cepa *B. loti* NZP 2309. Los valores de cada espectro están expresados en ppm.

Tabla 1. 1.- Listado de desplazamientos químicos del ^1H y el ^{13}C para el glucano cíclico β (1-3), β (1-6) con DP=11 de *B. loti* NZP 2309.

Asignación de desplazamiento químico	^1H (ppm)	n° de protones	^{13}C (ppm)	n° de carbonos
1(1-3), 1(3-6)	4.70; 4.75; 4.81; 4.83	4	103.0	nr
1(1-6)	4.42; 4.43; 4.44	7	104.0	nr
1(terminal)	4.44	nr	103.3	nr
2(1-3)	3.51; 3.52; 3.54	nr	73.8	nr
2(1-6)	3.27; 3.31; 3.35	nr	73.8	nr
2(3-6)	3.55	nr	73.8	nr
2(terminal)	3.32	nr	73.4	nr
3(1-3)	3.72; 3.80	nr	84.0; 84.2; 85.0	2:1:1
3(1-6)	3.49	nr	76.3	nr
3(3-6)	3.50	nr	73.6	nr
3(terminal)	3.58	nr	75.0	1
4(1-3)	3.54	nr	69.9; 70.18; 70.3	nr
4(1-6)	3.50	nr	70.0	nr
4(3-6)	3.42	nr	70.2	nr
4(terminal)	3.38	nr	70.3	nr
5(1-3)	3.63	nr	75.5	nr
5(1-6)	3.65	nr	76.3	nr
5(3-6)	3.70	nr	76.8	1
5(terminal)	3.68	nr	76.8	1
6(1-3)	3.70; 3.90	nr	61.50	3
6(1-6)	3.83; 4.20	6	69.50	nr
6(3-6)	3.87; 4.20	1	70.50	1
6(terminal)	3.70; 3.90	nr	61.50	1

R. 2.- ESTUDIO DE LA SÍNTESIS *IN VITRO* DE GLUCANOS CÍCLICOS DE *B. LOTI* NZP 2309

Con el objeto de estudiar la biosíntesis de los glucanos cíclicos en la cepa lenta *B. loti* NZP 2309, se purificaron membranas internas de dicha cepa (sección MM. 6), las cuales se incubaron con UDP-[¹⁴C]Glc (sección MM. 7) y se analizó la cinética de incorporación de radioactividad a los productos solubles e insolubles en 10% (p/v) de TCA (Figura 1. 9). Se observó que la radioactividad asociada a los productos solubles aumenta con el tiempo de incubación (Figura 1. 9 A). El agregado de UDPGlc no radioactiva (experimento de pulso y caza, sección MM. 7) a los 20 min de la reacción, frenó la incorporación de radioactividad en la fracción soluble, la cual se mantuvo constante durante el tiempo de incubación (Figura 1. 9 A). En la fracción insoluble, el comportamiento observado fue diferente, ya que se observó un incremento de la radioactividad en el tiempo, luego de agregar UDPGlc no radioactiva (Figura 1. 9 B).

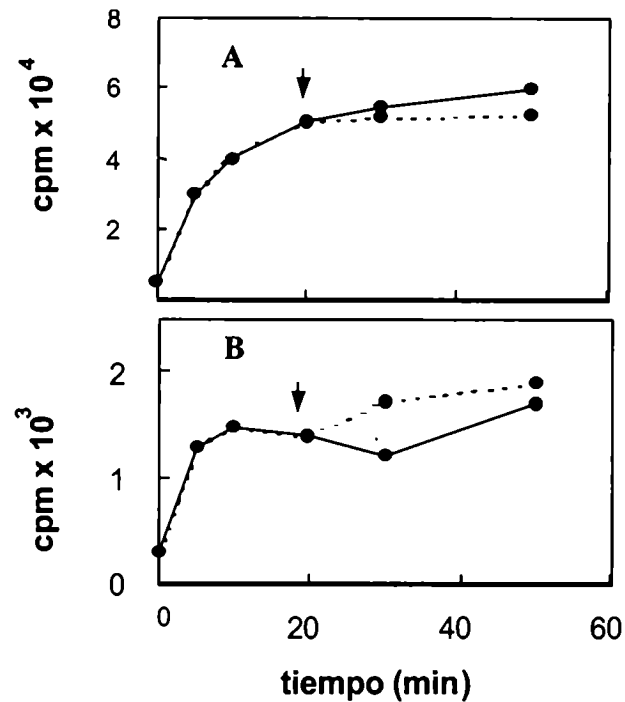


Figura 1. 9.- Cinética de la reacción de síntesis de glucanos con membranas internas de la cepa *B. loti* NZP 2309. Las membranas internas se incubaron con UDP(^{14}C)-Glc como se describe en la sección MM.7. Se midió la incorporación de (^{14}C -Glc) en los productos solubles (A) y en los productos TCA insolubles (B). Las líneas llenas indican los valores obtenidos con UDPGlc radioactiva. Las líneas punteadas indican los valores obtenidos luego del agregado de 2mM UDPGlc no radioactiva (experimento de pulso y caza). El agregado de UDPGlc no radioactiva se indica con una flecha

R. 2. 1.- Separación de los productos sintetizados *in vitro* en una cromatografía de filtración molecular

Los productos solubles formados luego de la incubación de las membranas internas con UDP-[¹⁴C]Glc, se analizaron por cromatografía en una columna de *Bio-Gel P4* analítica (Figura 1. 10). A 30°C, se obtuvo un producto con un Kav de 0,38, cuyo volumen de elusión es mayor que el de los glucanos celulares de la muestra 3 y similar al de los glucanos sintetizados *in vitro* por membranas de *B. japonicum* USDA 110 (Kav = 0,37) (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993) (Figura 1. 10). Cuando la reacción se llevó a cabo a 10°C, además del producto con Kav= 0,38, se detectaron compuestos con un grado de polimerización mayor que eluyeron de la columna entre las fracciones 1 a 11 (Figura 1. 11). Este comportamiento también se observó en una reacción similar a la anterior, al incubar con membranas internas de *B. japonicum*, en la cual los compuestos de mayor tamaño que se formaron, se identificaron como glucanos relacionados con laminarina (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993).

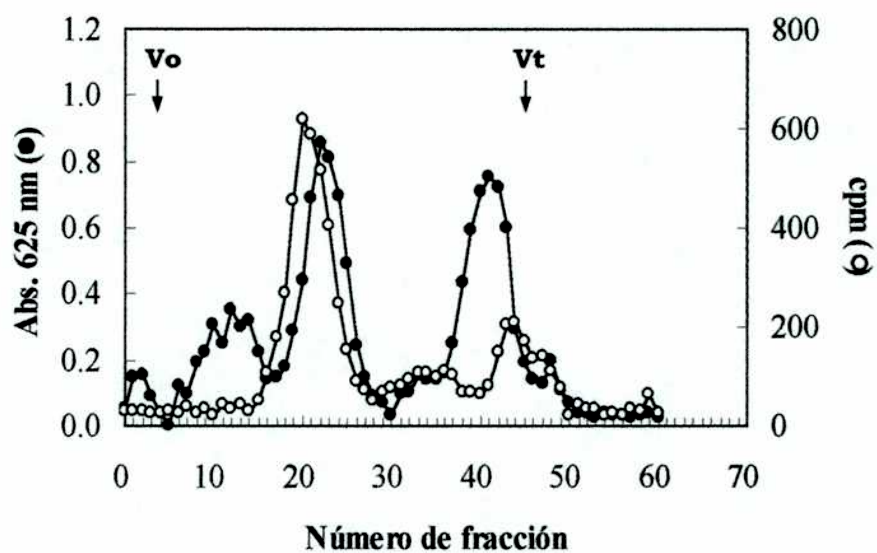


Figura 1. 10.- Cromatografía en columna de *Bio-Gel P4* analítica, de los productos sintetizados *in vitro* (○) a 30°C y acumulados *in vivo* por la cepa *B. loti* NZP 2309 (●). Vo, volumen de exclusión; Vt, volumen total.

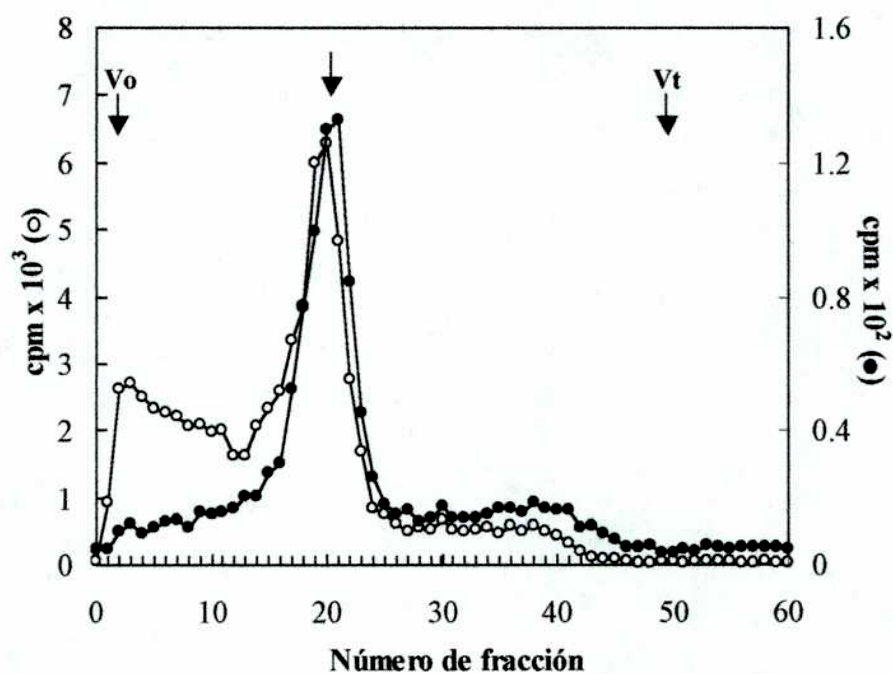


Figura 1. 11.- Cromatografía en columna de *Bio-Gel P4* analítica, de los productos sintetizados *in vitro* por la cepa *B. loti* NZP2309. La síntesis se llevó a cabo a 10 (○) y a 30 °C (●). Vo, volumen de exclusión; Vt, volumen total. La flecha indica la posición en que eluye el glucano sintetizado *in vitro*, a 30 °C, por *B. japonicum* USDA110.

R. 2. 2.- Identificación del tipo de enlace formado por los productos sintetizados *in vitro*

R. 2. 2. 1.- Hidrólisis total y parcial de los productos solubles

Los productos solubles obtenidos de la incubación de membranas internas con UDP-[¹⁴C]Glc a 30°C (fracciones 18 a 26) y a 10°C (fracciones 1 a 11 y fracciones 18 a 26) se recuperaron de la columna de *Bio-Gel P4* analítica y fueron hidrolizados en forma total o parcial (sección MM. 9. 1 y MM. 9. 2). Los compuestos hidrolizados fueron separados por cromatografía en papel en los solventes A o B (sección MM. 10) y los productos se identificaron por comparación con estándares no radioactivos separados en las mismas condiciones cromatográficas. El análisis de los productos de la hidrólisis total de los compuestos eluidos con un K_{av} de 0,38 a ambas temperaturas reveló la presencia de glucosa, sugiriendo que los compuestos sintetizados por la cepa *B. loti* NZP 2309 son glucanos (Figura 1. 12 A). Por otra parte, la hidrólisis parcial de dichos compuestos, dió como resultado dos productos mayoritarios identificados como glucosa y laminaribiosa (glucosa- β (1-3)-glucosa), además se identificó genciobiosa (glucosa- β (1-6)-glucosa) y una serie de oligosacáridos con un grado de polimerización mayor (Figura 1. 12 B). La hidrólisis parcial de los compuestos eluidos entre las fracciones 1 a 11, que provienen de la síntesis a 10°C, generaron dos productos: glucosa y laminaribiosa, sugiriendo que tales compuestos son glucanos con uniones β (1-3), similares a la laminarina (datos no mostrados).

Los compuestos que migraron como laminaribiosa (L2) y genciobiosa (G2) fueron eluidos del papel y se separaron en una electroforesis en papel con el solvente C (sección MM. 10). En estas condiciones, solamente los disacáridos que tienen uniones 1-3 permanecen en el origen de siembra, mientras que los otros disacáridos de glucosa se comportan como aniones. En este sentido se observó que el compuesto G2 reducido comigró con el estándar genciobiositol mientras que el compuesto L2 reducido permaneció en el origen de siembra (dato no mostrado). Los anómeros α y β de los distintos disacáridos de glucosa se separaron por electroforesis en papel con el solvente D (ver sección MM. 10). En estas condiciones se observó que los compuestos G2 y L2 eran genciobiosa y laminaribiosa respectivamente, confirmando de este modo que el compuesto sintetizado *in vitro* por membranas de la cepa *B. loti* NZP 2309 que eluye con un K_{av} = 0,38 es un glucano formado por uniones β (1-3), β (1-6) y las fracciones 1 a 11, contienen glucanos formados por uniones β (1-3), tipo laminarina (datos no mostrados).

R. 2. 3.- Determinación de la estructura cíclica en los productos sintetizados *in vitro* por la cepa NZP 2309

Los glucanos sintetizados *in vitro* que eluyeron de una columna de *Bio-Gel P4* con un K_{av} de 0,38, se trataron con borohidruro de sodio (sección MM. 11). Posteriormente, los glucanos reducidos se sometieron a una hidrólisis total y los productos de esta reacción se separaron por electroforesis en papel (sección MM. 10). Los compuestos separados se identificaron con estándares internos incluidos en la electroforesis. La radioactividad detectada estuvo asociada a un solo producto que se identificó como glucosa (Figura 1. 12 C). Este resultado sugiere que los glucanos sintetizados tienen una estructura cíclica.

Por otra parte, la ausencia de radioactividad asociada a sorbitol, otro compuesto que se utilizó como estándar interno, indica que no se encuentran glucanos lineales dentro de los productos sintetizados *in vitro* (Figura 1. 12 C).

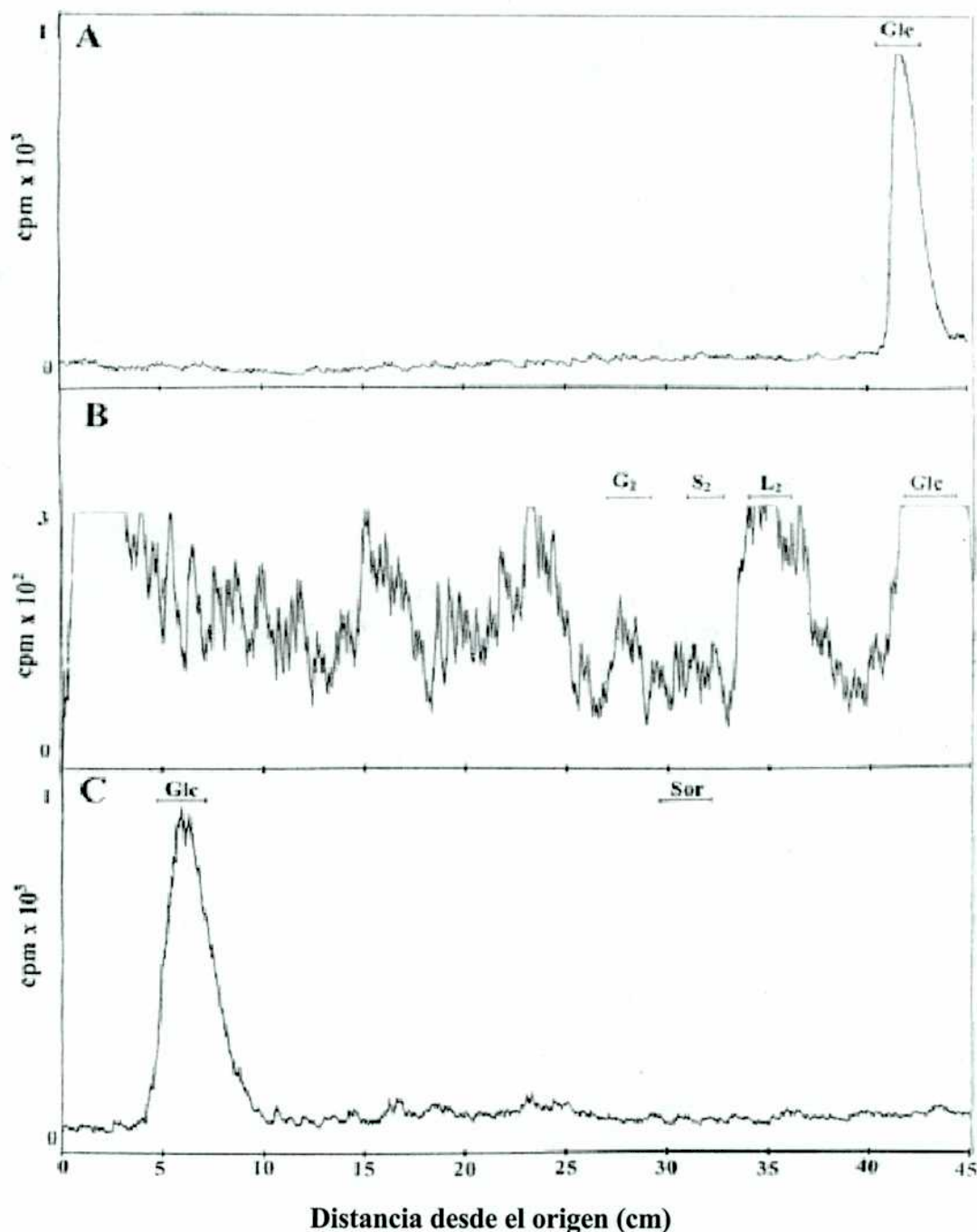


Figura 1. 12.- Análisis del compuesto sintetizado *in vitro* por la cepa NZP2309, que eluye de la columna de *Bio-Gel P4* analítica en las fracciones 16 a 24, con un K_{av} = 0,38. **A.** Cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis ácida total. **B** Cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis ácida parcial. **C** Electroforesis en papel de los productos de la hidrólisis total, previamente reducidos con borohidruro de sodio. Estándares internos no radioactivos : Glc, glucosa ; L2, laminaribiosa ; S2, soforosa ; G2, genciobiosa ; S, sorbitol

R. 2. 4.- Identificación de ramificaciones en la estructura cíclica del glucano sintetizado *in vitro* por degradación de Smith.

Los glucanos sintetizados *in vitro* a 30°C, que eluyeron de una columna de *Bio-Gel P4* con un K_{av} de 0,38, se sometieron a sucesivos tratamientos que incluyeron: oxidación con periodato, reducción con borohidruro y posterior hidrólisis ácida, según se describe en la sección MM. 12. Luego del primer tratamiento, los productos se sembraron en una columna de *Bio-Gel P2* y se detectaron dos compuestos radioactivos. La mayoría de la radioactividad eluyó con un K_{av} similar al glucano no tratado. El otro compuesto eluyó cerca del volumen total y contenía aproximadamente 4,8% de la radioactividad total presente en el glucano sin tratar. El compuesto radioactivo eluido cerca del V_t , se sometió a una cromatografía en papel y se identificó como glicerol. Posteriormente un segundo tratamiento de oxidación, reducción e hidrólisis ácida seguido de una cromatografía en columna de *Bio-Gel P2* liberó aproximadamente 5,8% de la radioactividad que eluyó cerca del V_t . En este caso también se identificó glicerol como único producto asociado a la fracción radioactiva eluida cerca del V_t . En un tercer tratamiento similar a los anteriores, no se detectó liberación de radioactividad en fracciones que no estuvieran asociadas con el glucano y tampoco se detectaron cambios en el volumen de elución del mismo. Estos resultados sugieren la ausencia de extremos reductores libres en el glucano sintetizado *in vitro*. La resistencia que presenta dicho glucano a la oxidación con periodato, indica que la estructura del mismo no presenta grupos hidroxilos vecinos libres que pueden ser fácilmente oxidados. En este sentido, los resultados obtenidos son los esperados para un polímero de glucosas formado por enlaces $\beta(1-3)$ y una ramificación que tiene al menos dos residuos de glucosas unidas por un enlace $\beta(1-3)$. Por otra parte, el glucano sometido a las tres rondas consecutivas de oxidación, reducción e hidrólisis y posteriormente eluido de la columna de *Bio-Gel P2*, fue hidrolizado en forma total (sección MM. 9. 1). Los productos de la hidrólisis se cromatografiaron y se identificó únicamente glucosa. La ausencia de sorbitol en estos productos, sugiere que el glucano analizado no presenta un extremo reductor libre y tiene una estructura cíclica (dato no mostrado, tal como se observó en el ensayo anterior (Figura 1. 12 C).

R. 2. 5.- Caracterización de productos insolubles en TCA obtenidos de la síntesis *in vitro*

Para identificar compuestos asociados con proteínas en la fracción insoluble en TCA, la mezcla de reacción de síntesis de glucanos se frenó con una solución 10% (p/v) de TCA y luego de centrifugar, el precipitado se dividió en dos partes. Una de ellas se sometió a hidrólisis parcial y la otra a electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (sección MM. 8), con o sin tratamiento previo con laminarinasa (sección MM. 13). La hidrólisis parcial y la posterior cromatografía de los productos hidrolizados reveló la presencia de glucosa, laminaribiosa y oligosacáridos con enlaces $\beta(1-3)$. La electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS y la posterior fluorografía del mismo, muestra que parte de la radioactividad está asociada con una proteína que tiene una masa molecular aproximada de 85 kDa (Figura 1. 13 B). Sin embargo, la mayoría de la radioactividad queda retenida en el origen de siembra del gel (Figura 1. 13 B). El tratamiento previo de esta fracción con laminarinasa, redujo la radioactividad asociada con el material retenido en el origen de siembra del gel. Este resultado indica que la fracción insoluble en TCA contiene dos compuestos asociados con

glucosa: una glucoproteína y un glucano con uniones β (1-3) (similar a la laminarina).

En los experimentos de pulso y caza (sección MM. 7), luego del agregado de una solución 2mM de UDPGlc no radioactiva, no se detectó radioactividad asociada a la proteína de 85 kDa, sin embargo, no se observó ningún cambio significativo en la cantidad de radioactividad asociada a los productos insolubles retenidos en el origen de siembra, la cual se mantuvo constante (Figura 1. 13 B).

Estos resultados sugieren que la proteína de 85 kDa podría ser un intermediario o precursor de la síntesis de glucanos solubles β (1-3), β (1-6); de glucanos insolubles tipo laminarina β (1-3) o de ambos compuestos. Además, se observó que dichos resultados son similares a los reportados previamente en la cepa lenta *B. japonicum* USDA 110, la cual sintetiza glucanos con enlaces β (1-3), β (1-6) (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993).

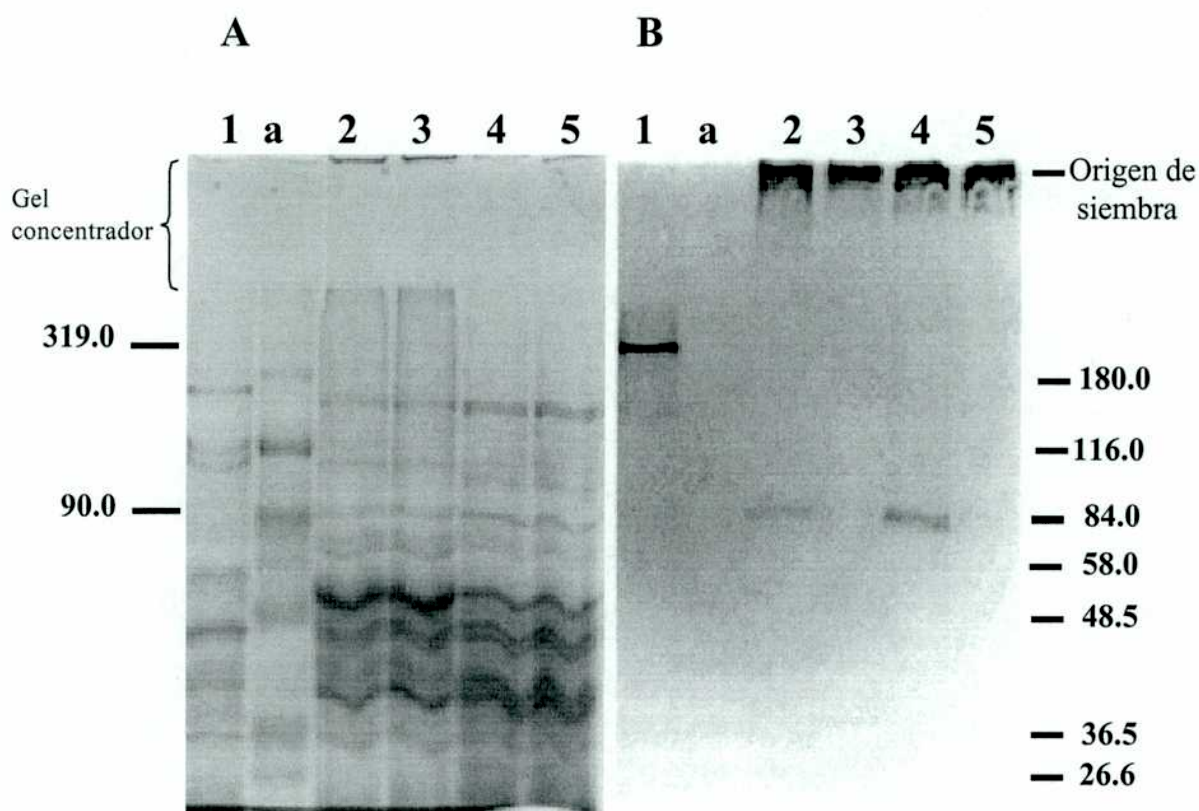


Figura 1. 13.- Electroforesis en gel de polacrilamida con SDS de los productos insolubles de la síntesis *in vitro* de glucanos. **A**, proteínas teñidas con *Coomassie Blue*; **B**, radioactividad detectada por fluorografía. Las membranas internas se incubaron con UDPGlc radioactiva durante 15 min a 10 °C (calles 1, 2, 3, 4 y 5). En los experimentos de pulso y caza, luego de 15 min de incubación, se agregó UDPGlc no radioactiva y la reacción se continuó durante 15 min antes de inactivar con TCA al 10% (calles 3 y 5). Calle 1, membranas internas de *A. tumefaciens* 348; calles 2 y 3, membranas internas de la cepa *B. japonicum* USDA 110; calles 4 y 5, membranas internas de la cepa *B. loti* NZP 2309. Calle a; marcadores de masa molecular, los valores de estas últimas (kDa) se muestran a la derecha de la figura. La masa molecular de la proteína intermediaria de *A. tumefaciens*, determinada por secuenciación (319.0 kDa) y la proteína detectada en *B. japonicum* USDA110 (90.0 kDa), se muestran a la izquierda de la figura.

R. 3.- IDENTIFICACION DEL TIPO DE GLUCANO QUE PRODUCEN LAS CEPAS DE *M. LOTI* NZP 2213 Y NZP 2037

R. 3. 1.- Separación de los productos acumulados *in vivo* en una cromatografía de filtración molecular

Los productos de la extracción con TCA de cada cepa se sembraron en una columna de *Bio-Gel P4*. Los perfiles de elución de dichos compuestos se compararon con los perfiles obtenidos de los productos de la síntesis *in vitro*, luego de la incubación de las membranas internas con UDP-[¹⁴C]Glc a 30°C. Los compuestos acumulados *in vivo* por la cepa NZP 2213 eluyeron con un Kav menor que los productos de la síntesis *in vitro* (Figura 1. 14 A). Por otra parte, los compuestos acumulados *in vivo* y sintetizados *in vitro* por la cepa NZP 2037, eluyeron con un Kav similar (Figura 1. 14 B). Dichos perfiles coinciden con los obtenidos con extractos de diferentes rizobios de crecimiento rápido y de *A. tumefaciens* que acumulan glucanos $\beta(1-2)$ cíclicos (Iñón de Iannino et al., 1989 ; Lepek et al., 1990).

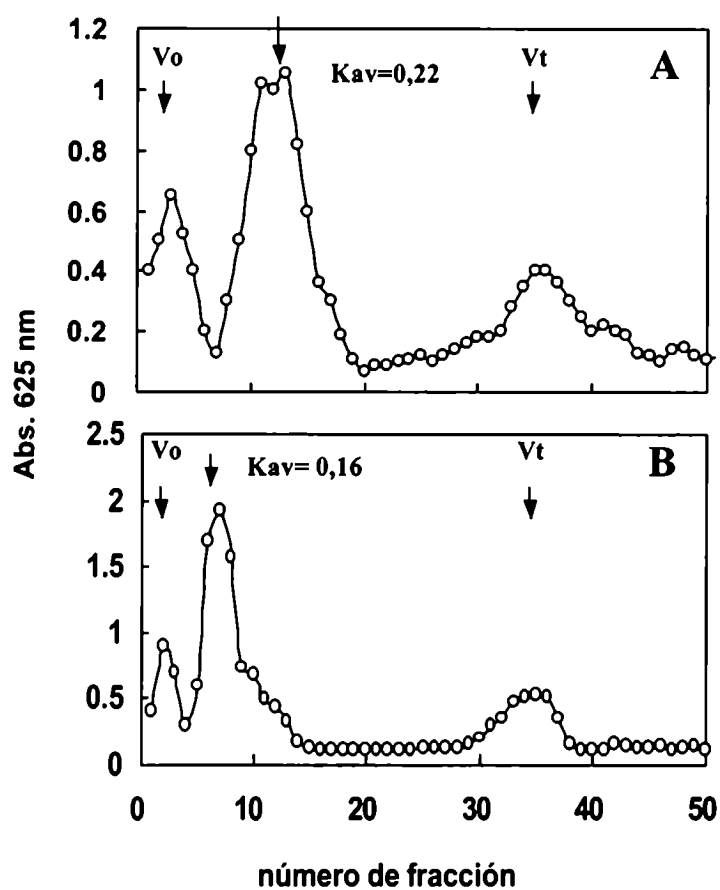


Figura 1. 14.- Perfil de glucanos acumulados *in vivo* separados en una cromatografía en columna de *Bio-Gel P4* de glucanos acumulados *in vivo* por las cepas de *M. loti*. A, cepa NZP 2037. B, cepa NZP 2213. V_o , volumen de exclusión. V_t , volumen total.

R. 3. 2.- Identificación de productos aniónicos acumulados *in vivo*

En trabajos anteriores se había reportado que los glucanos cíclicos de rizobios pueden estar sustituidos con residuos aniónicos no glicosídicos (Batley et al., 1987). Estos residuos modifican el perfil de elusión de dichos glucanos en una cromatografía en columna de *Bio-Gel P4* y se ha observado que tienen con un K_{av} menor que los glucanos neutros. Teniendo en cuenta las diferencias en los K_{av} de los compuestos acumulados *in vivo* y sintetizados *in vitro* por la cepa NZP 2213, se quiso determinar si los primeros presentaban sustituyentes aniónicos. De este modo, los compuestos antrona-positivos que eluyeron de una columna de *Bio-Gel P4*, con un $K_{av}=0,16$ se sembraron posteriormente en una columna de *DEAE-Sephadex A-25* y se eluyeron con distintas concentraciones de NaCl (sección MM. 10. 2). El perfil de elusión de los compuestos acumulados *in vivo* por la cepa NZP 2213 sugiere que dichos compuestos están formados principalmente por especies aniónicas dado que se detectan compuestos que eluyen con 50 y 200 mM de NaCl (fracciones 2 y 3 respectivamente), y en menor proporción por especies neutras que eluyen con agua bidestilada (fracción 1)(Figura 1. 15 A).

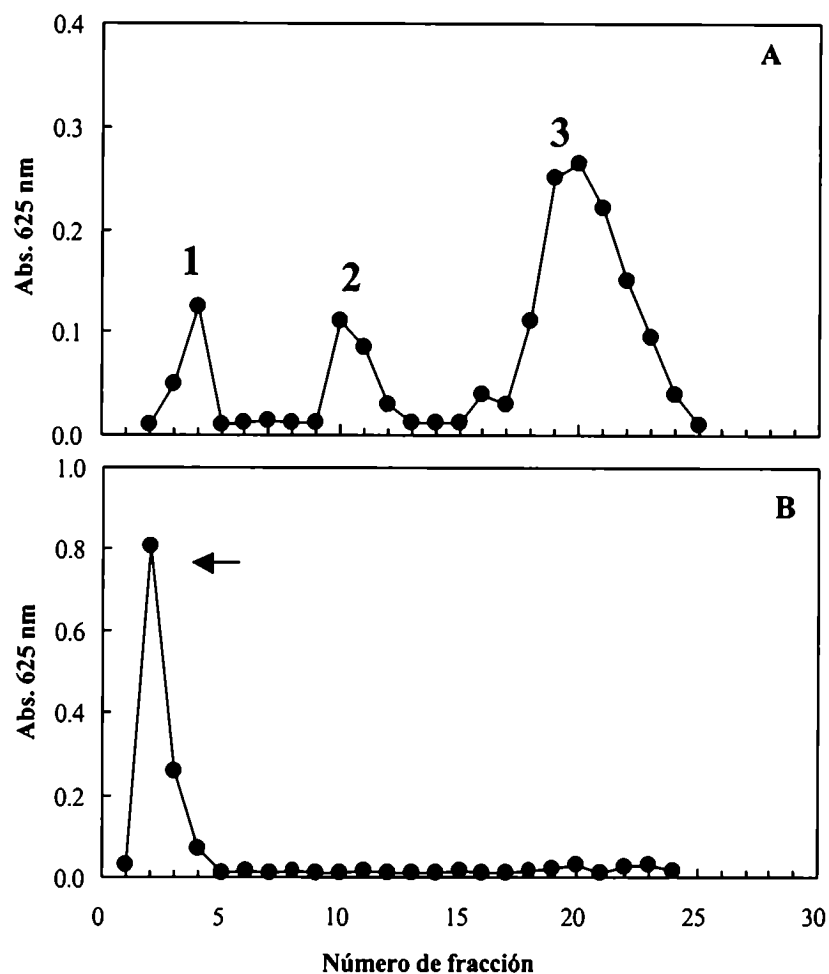


Figura 1. 15.- Separación de los productos acumulados *in vivo* por la cepa *M. loti* NZP 2213 en una columna de *DEAE- Sephadex* A-25. A, antes del tratamiento con NaOH. B, después del tratamiento con NaOH. Antes del tratamiento con NaOH, la fracción 1 está compuesta por especies neutras que eluyeron agua bidestilada. Las fracciones 2 y 3 tienen especies aniónicas que eluyen con soluciones de NaCl 50 y 200 mM, respectivamente. La flecha indica el perfil de elución de las fracciones 2 y 3 luego del tratamiento con NaOH.

Se ha reportado que los glucanos de *A. tumefaciens*, *S. meliloti* y *S. fredii* están sustituidos con residuos de fosfoglicerol (Iñón de Iannino et al., 1996). Teniendo en cuenta estos antecedentes, los glucanos de la cepa NZP 2213 que eluyeron de la columna de *DEAE-Sephadex* A-25 con 50 y 200mM NaCl (Figura 1. 15 A), se trataron como se describe en la sección MM. 9. 3 y se sembraron nuevamente en una columna de *DEAE-Sephadex* A-25. En la Figura 1. 15 B se muestra el perfil de elusión de los compuestos aniónicos tratados con NaOH. Los mismos eluyeron de la columna de *DEAE-Sephadex* A-25 con agua bidestilada como los glucanos neutros. Estos resultados sugieren que el tratamiento con NaOH removió los sustituyentes aniónicos.

Por otra parte, luego de sembrar dichos compuestos en una columna de *Bio-Gel P4* se observa que eluyen con un Kav similar al de los glucanos neutros sintetizados *in vitro* por esta misma cepa (dato no mostrado). Estos resultados sugieren que las diferencias en los Kav de los glucanos acumulados *in vivo* y sintetizados *in vitro* por la cepa NZP 2213, se deben a la presencia de sustituyentes aniónicos en los primeros, que modifican el perfil de elusión en una columna de tamiz molecular.

Por otra parte, para evaluar si los glucanos celulares de la cepa *M. loti* NZP 2037 tienen sustituyentes aniónicos similares a los de la cepa *M. loti* NZP 2213, se realizó una extracción de los mismos, tal como se describe en la sección MM. 10. 1. Los glucanos extraídos se resolvieron en una placa de *Sílica-Gel-60* (sección MM. 10. 1). Luego de revelar la placa de TLC, se observó que dichos glucanos están formados por especies neutras y cargadas tal como se observó con los glucanos de la cepa *M. loti* NZP 2213. Estos resultados sugieren que ambas cepas de *M. loti* producen glucanos similares formados por una mezcla de especies neutras y cargadas (Figura 1. 16).

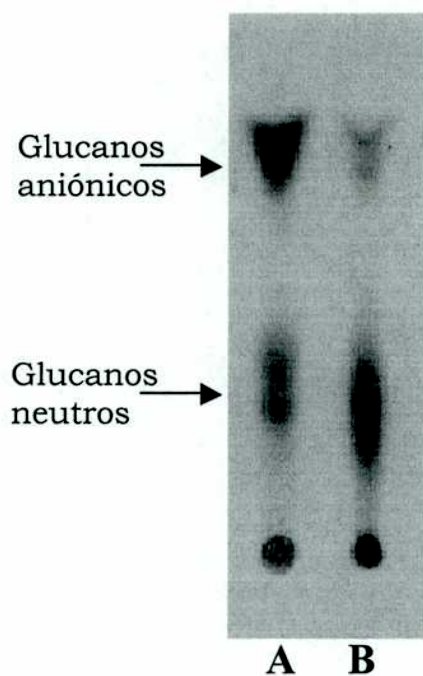


Figura 1. 16.- Cromatografía en capa delgada de los glucanos acumulados *in vivo* por cepas de *M. loti*. A, cepa NZP 2213 ; B, cepa NZP 2037. Las flechas indican la movilidad relativa de los glucanos neutros y aniónicos.

R. 3. 3.- Identificación del tipo de enlace que forman los productos acumulados *in vivo*

Los productos acumulados *in vivo* por las cepas de *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037 que eluyeron de la columna de *Bio-Gel P4*, se sometieron a distintos tratamientos de hidrólisis (sección MM. 9. 1 y MM. 9. 2). Los productos de la hidrólisis total se separaron en una cromatografía en papel (sección MM. 9. 1) y en ambas cepas se detectó un único producto identificado como glucosa, sugiriendo que los productos acumulados *in vivo* son glucanos (datos no mostrados). En la cromatografía de los productos de la hidrólisis parcial se detectó soforosa, glucosa y oligosacáridos con distinto grado de polimerización, sugiriendo que las cepas *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037 acumulan glucanos con uniones $\beta(1-2)$ (datos no mostrados).

R. 3. 4. - Síntesis *in vitro* de glucanos

Con el objeto de estudiar la cinética de síntesis de glucanos de las cepas *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037, las membranas internas de cada una de ellas se incubaron con UDP-[^{14}C]Glc y se determinó la incorporación de glucosa radioactiva a los productos solubles e insolubles. Los resultados obtenidos con las cepas NZP 2213 y NZP 2037 se muestran en la Figura 1. 17. En la reacción de síntesis de glucanos con membranas internas de la cepa *M. loti* NZP 2213, se observó que la incorporación de radioactividad a los compuestos de la fracción soluble se incrementa con el tiempo de incubación (Figura 1. 17 A). En el ensayo de pulso y caza (sección MM. 7), luego de agregar UDPGlc no radioactiva, se observa que la radioactividad asociada a dicha fracción permanece constante en el tiempo (Figura 1. 17 A). Este comportamiento fue similar con membranas internas de la cepa *M. loti* NZP 2037 (Figura 1. 17 B).

Por otra parte, si se analiza la cinética de incorporación de [^{14}C]-Glc a los productos insolubles formados por la cepa NZP 2213, se observa que la radioactividad se incrementa con el tiempo de incubación. Sin embargo, cuando se agrega UDPGlc no radioactiva (experimento de pulso y caza), la radioactividad disminuye con el tiempo de incubación (Figura 1. 17 C). Este comportamiento, similar al reportado previamente en otros rizobios y en *A. tumefaciens* (Zorreguieta & Ugalde, 1986 ; Iñón de Iannino et al., 1996), sugiere que los compuestos insolubles en TCA se comportan como intermediarios de los productos solubles. Resultados similares se obtuvieron con membranas internas de la cepa NZP 2037 (Figura 1. 17 D)

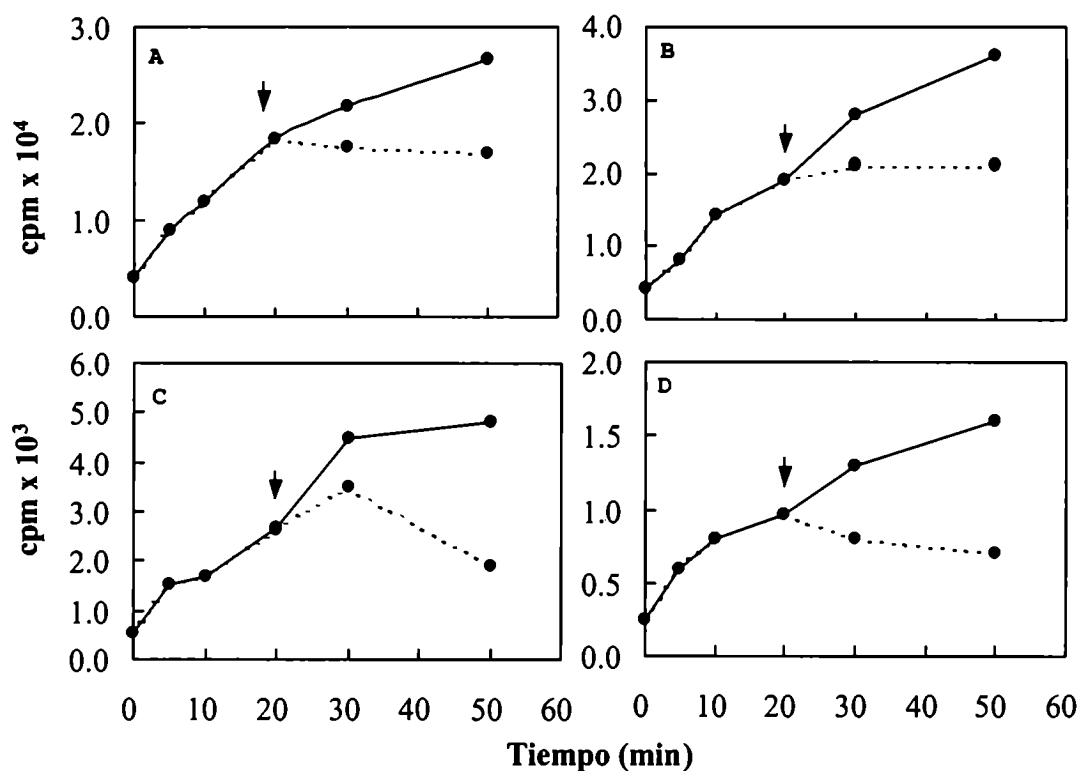


Figura 1. 17.- Cinética de la reacción de síntesis de glucanos con membranas internas de las cepas *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037. Las membranas internas se incubaron con UDP-(¹⁴C)Glc como se describe en la sección MM.7. Se midió la incorporación de (¹⁴C-Glc) en los productos solubles (A y B) y en los productos TCA insolubles (C y D) en las cepas NZP 2213 (A y C) y NZP 2037 (B y D). Las líneas llenas indican los valores obtenidos con UDPGlc radioactiva. Las líneas punteadas indican los valores obtenidos luego del agregado de 2mM UDPGlc no radioactiva (experimento de pulso y caza). El agregado de UDPGlc no radioactiva se indica con una flecha.

R. 3. 5.- Identificación del tipo de enlace formado por los productos sintetizados *in vitro*

R. 3. 5. 1.- Hidrólisis total y parcial de los productos solubles

Los principales compuestos eluidos de la columna de *Bio-Gel P4* que provienen de las cepas de *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037 (K_{av} = 0,20 y 0,21 respectivamente) se hidrolizaron en distintas condiciones, según se describió en la sección MM. 9. 1. y MM. 9. 2. Los compuestos hidrolizados fueron separados por cromatografía en papel (sección MM. 10.). El análisis de los productos de la hidrólisis total de cepa NZP 2213, reveló la presencia de un único compuesto identificado como glucosa, sugiriendo que los compuestos sintetizados son glucanos (Figura 1. 18 A). Resultados similares se observaron con los productos de la cepa NZP 2037 (datos no mostrados). Por otra parte, el resultado de la hidrólisis parcial reveló que los glucanos sintetizados por la cepa *M. loti* NZP 2213 tiene glucosa, soforosa (glucosa- β (1-2)-glucosa) y una serie de oligosacáridos con un grado de polimerización variable, sugiriendo que dichos glucanos están formados por glucosas unidas por enlaces β (1-2) (Figura 1. 18 B). Resultados similares se obtuvieron con la cepa NZP 2037 (datos no mostrados). Estos datos además, son similares a los reportados previamente en otras especies de crecimiento rápido (Iñón de Iannino et al., 1996 , Zorreguieta & Ugalde, 1986) y en una cepa aislada de nódulos de *L. glaber* (Lepek et al., 1990).

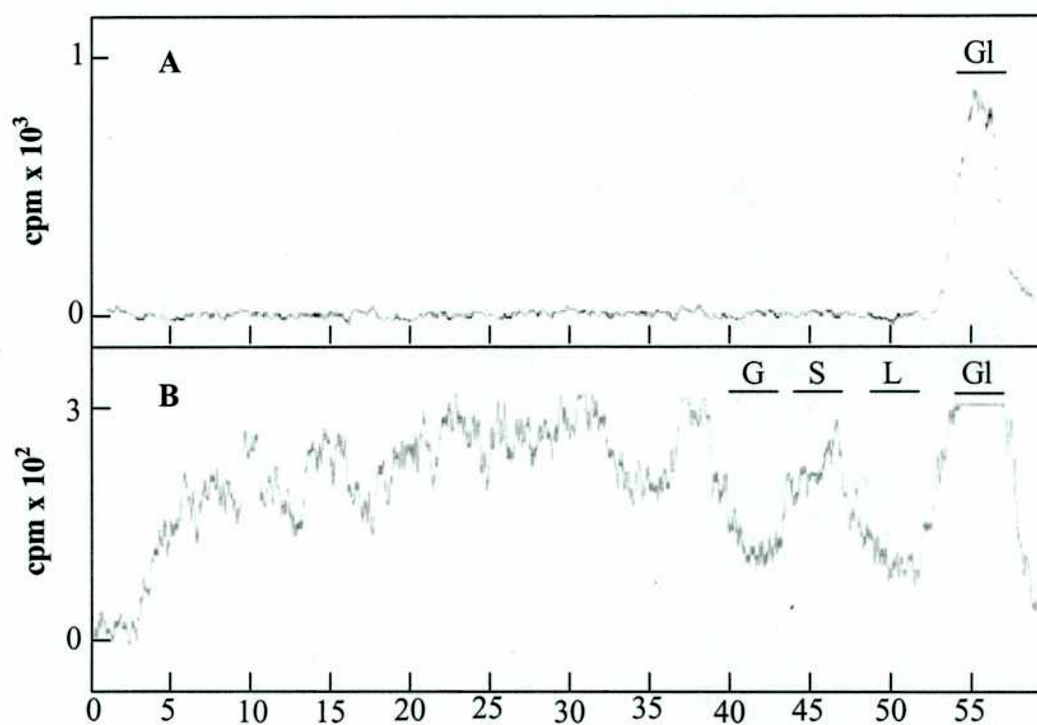


Figura 1. 18.- Análisis de los compuestos sintetizados *in vitro* por la cepa *M. loti* NZP 2213. **A.** Cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis ácida total. **B** Cromatografía en papel de los productos de la hidrólisis ácida parcial. Estándares internos no radioactivos : Gl, glucosa ; L, laminaribiosa; G, genciobiosa; S, soforosa.

R. 3. 6.- Identificación de proteínas intermediarias en la síntesis de glucanos

Para identificar proteínas asociadas con la síntesis de glucanos en las cepas de *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037, se incubaron membranas internas de ambas cepas con UDP-[¹⁴C]Glc como se describe en la sección MM. 7. La reacción de síntesis se frenó con una solución 10% (p/v) de TCA (sección MM. 7). Los productos insolubles en TCA se sembraron y separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Figura 1. 19 A) y la radioactividad se detectó con la posterior fluorografía realizada según lo descrito en la sección MM. 7. (Figura 1. 19 B). En la fracción insoluble de cada cepa, se detectó una proteína de alto peso molecular similar a la proteína de 319 kDa descrita previamente en *S. fredii* y *A. tumefaciens* (Zorreguieta & Ugalde, 1986 ; Iñón de Iannino et al., 1996) (Figura 1. 19 B). La proteína detectada en la fracción de membranas internas de la cepa NZP 2213, tiene una masa molecular mayor que la de la cepa NZP 2037 (Figura 1. 19 B). En los experimentos de pulso y caza se observó que luego del agregado de UDPGlc no radioactiva, la radioactividad asociada a dichas proteínas disminuye. Este comportamiento también ha sido observado previamente con la proteína de 319 kDa de *A. tumefaciens* y de otros rizobios, sugiriendo que las mismas participan como intermediarias en la síntesis de glucanos β (1-2) (Figura 1. 19 B).

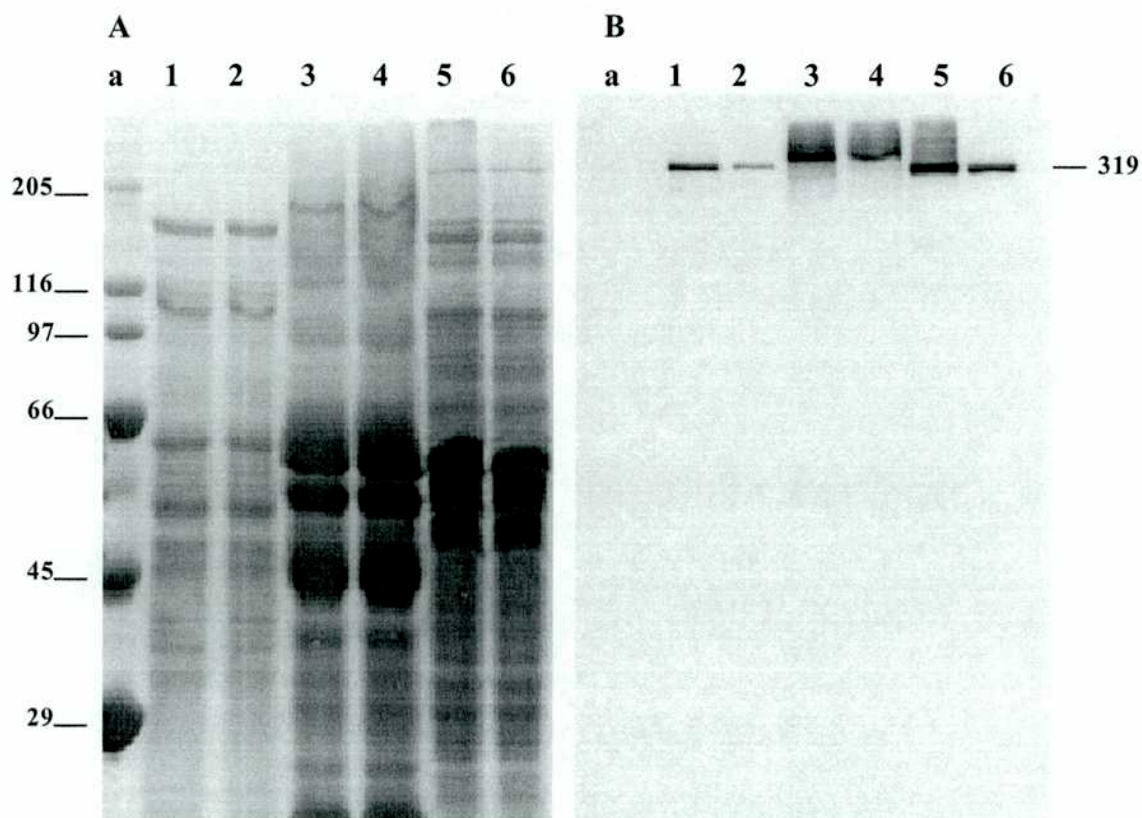


Figura 1. 19.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de los productos insolubles de la síntesis *in vitro* de glucanos de las cepas de *M. loti*. **A**, proteínas teñidas con *Coomassie Blue*; **B**, radioactividad detectada por fluorografía. Las membranas internas se incubaron con UDPGlc radioactiva durante 15 min a 10 °C (calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6). En los experimentos de pulso y caza, luego de 15 min de incubación, se agregó UDPGlc no radioactiva y la reacción se continuó durante 15 min antes de inactivar con TCA al 10% (calles 2, 4 y 6). Calle 1 y 2, membranas internas de la cepa NZP2037; calles 3 y 4, membranas internas de la cepa NZP2213; calles 5 y 6 membranas internas de cepa *S. fredii* USDA 191; calle a; marcadores de masa molecular, los valores de estas últimas (kDa) se muestran a la izquierda de la figura. La masa molecular de la proteína intermediaria de *A. tumefaciens*, determinada por secuenciación (319 kDa), se muestra a la derecha de la figura.

R. 4.- CAPACIDAD DE NODULACION Y FIJACION DE NITROGENO DE CEPAS DE RIZOBIOS QUE ESTABLECEN SIMBIOSIS CON LOTUS SPP

Se realizaron ensayos de nodulación con las cepas de *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037 y la cepa lenta *B. loti* NZP 2309 (Tabla 1. 2) para comparar la capacidad de las mismas para formar nódulos efectivos en distintas especies de *Lotus* y en otras leguminosas (Tabla 1. 2). La cepa *M. loti* NZP 2037 formó nódulos efectivos en todas las especies de *Lotus* analizadas, mientras que la cepa NZP 2213 formó nódulos efectivos en *L. glaber* y *L. corniculatus* var. *hirsutus* y nódulos inefectivos en *L. pedunculatus* (Tabla 1. 2). El comportamiento de esta última cepa respecto a la nodulación con *L. corniculatus* var. *hirsutus* es diferente al reportado en otros trabajos (Pankhurst et al., 1987). A su vez, la cepa lenta de *B. loti* NZP 2309 forma nódulos efectivos en *L. pedunculatus* y *L. corniculatus* var. *hirsutus* y no forma nódulos en *L. glaber* (Tabla 1. 2).

Por otra parte, la ausencia de nódulos en leguminosas de otros géneros que fueron inoculadas con cada una de las cepas antes mencionadas (*G. max* cv Mc Call, *G. max* cv Peking, *M. sativa* L y *T. alexandrinum* L.), sugiere que dichas cepas presentan una alta especificidad para formar nódulos con plantas del género *Lotus* (Tabla 1. 2).

Si se analiza conjuntamente el tipo de glucanos que producen las cepas *M. loti* NZP 2213, *M. loti* NZP 2037 y *B. loti* NZP 2309 y la capacidad de las mismas para formar nódulos efectivos (nódulos con capacidad reductora de acetileno) en las distintas especies de *Lotus*, los resultados indican que el tipo de glucano que produce cada cepa no está relacionado con la capacidad de las mismas para formar nódulos efectivos. En este sentido, las dos cepas de *M. loti* (cepas NZP 2213 y NZP 2037) producen glucanos similares con uniones $\beta(1-2)$, aunque forman nódulos efectivos en distintas especies de *Lotus*. Además, se observó que *L. pedunculatus* forma nódulos efectivos con dos rizobios que producen distinto tipo de glucano. Por otra parte, la cepa *M. loti* NZP 2037 produce glucanos con uniones $\beta(1-2)$ mientras que la cepa *B. loti* produce glucanos con uniones $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (resultados 1, 2 y 3 de este capítulo). Resultados similares se reportaron para la interacción soja-rizobio, en la cual las cepas que producen glucanos $\beta(1,2)$ (*S. fredii*) y glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (*B. japonicum* USDA 110) forman nódulos efectivos en la misma leguminosa (*G. max*) (Iñón de Iannino et al., 1996).

Por otra parte, se observó que la cepa *B. japonicum* USDA 110 forma nódulos efectivos con su hospedante habitual *G. max* y además es capaz de formar nódulos en *L. pedunculatus* y *L. corniculatus* var. *hirsutus* (Tabla 1. 2). Este resultado indica que existe un reconocimiento de señales tempranas entre la cepa *B. japonicum* USDA 110 y determinadas especies de *Lotus*, para la formación del nódulo. Estos nódulos tienen un fenotipo similar a los formados por la especie *B. loti* NZP 2309 pero no tienen actividad reductora de acetileno (Tabla 1. 2) y además no se logró aislar bacterias de los mismos. Este resultado sugiere que la bacteria *B. japonicum* USDA 110 es incapaz de invadir eficientemente los nódulos de ambas especies de *Lotus*. Se ha determinado que la estructura de los glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ es importante durante la etapa de infección de los nódulos y que dichos glucanos son supresores de respuesta de defensa de leguminosas. En este sentido, nuestros resultados sugieren que cada especie del género *Bradyrhizobium* produce glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ con una estructura específica y particular que podría estar involucrada en la especificidad para invadir de manera eficiente los nódulos de su hospedante habitual.

Tabla 1. 2.- Ensayo de nodulación y determinación de actividad de nitrogenasa en nódulos formados por distintas cepas de rizobios.

Cepas de rizobios											
	Control s/inocular		B. loti N2P 2213			B. loti N2P 2037			B. loti N2P 2309		
	N	ARA	N	ARA	N	N	ARA	N	N	ARA	B. japonicum USDA 110
leguminosa	AU	8,9 ± 2,5	PU	485,68 ± 110,36	PU	530,99 ± 117,66	AU	Nd	AU	ARA	Nd
<i>L. glaber</i>	AU	1.9 ± 0.6	PU	2,84 ± 0,71	PU	131,22 ± 97,61	PU	163,07 ± 99,03	PU	7,92 ± 2,2	
<i>L. pedunculatus</i>	AU	7.1 ± 4.3	PU	262,21 ± 31,08	PU	288,44 ± 89,34	PU	33,57 ± 12,42	PU	4,76 ± 2,33	
<i>L. corniculatus</i> var. <i>hirsutus</i>	AU	9.1 ± 0.7	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	PU	1200 ± 454,03	
<i>Glycine max</i> cv. Peking	AU	9.1 ± 0.1	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	PU	989,6 ± 344,75	
<i>Glycine max</i> cv. Mc Call	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	
<i>Medicago sativa</i> L	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	
<i>Trifolium alexandrinum</i> L	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	AU	Nd	

Referencias : N, formación de nódulos ; PN, presencia de nódulos ;AU, ausencia de nódulos ; la actividad de nitrogenasa se determinó por el método de reducción de acetileno. ARA : actividad reductora de acetileno expresada como nmoles etileno /h planta. Nd, no determinada.

DISCUSIÓN

Numerosos estudios han demostrado que los polisacáridos de pared son necesarios para la simbiosis mutualista leguminosa-rizobio. Estudios con mutantes en la síntesis de glucanos en *B. japonicum* han revelado que la estructura química de los glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ es importante para la invasión de los nódulos de soja, su hospedante habitual (Baghawat et al., 1996). Se ha demostrado que si se modifica la proporción de enlaces $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, se modifica la estructura de estos glucanos y la bacteria pierde la capacidad de formar nódulos efectivos (Baghawat et al., 1996). Además, se ha sugerido que estos compuestos suprimen respuestas de defensa en la leguminosa y que la estructura química de dichos glucanos determina su actividad como molécula supresora (Baghawat et al., 1999).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y dada la escasa información que existe acerca de la estructura de estos glucanos en otras especies del género *Bradyrhizobium*, se determinó la estructura química de los glucanos producidos por la cepa *B. loti* NZP 2309, que forma nódulos en especies de *Lotus*. Estudios de REP-PCR (sección MM. 18. 2) demostraron que *B. loti* NZP 2309 y *B. japonicum* USDA 110 son cepas diferentes pero están estrechamente relacionadas por análisis de PCR-RFLPs del ARN r 16S (sección MM. 18. 3, MM. 18. 4) (datos no mostrados).

Se determinó que la cepa NZP 2309 produce una familia de glucanos cíclicos con uniones $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, con distinto grado de polimerización, tal como se describió en *B. japonicum* (Rolin et al., 1992; Miller et al., 1990). Sin embargo, el grado de polimerización y la proporción relativa de los glucanos detectados en cada especie presenta características distintivas. Los glucanos cíclicos producidos por *B. loti* NZP 2309 están formados por una mezcla de especies neutras, no sustituidas, con DP= 10, 11 y 12, siendo la especie mayoritaria un glucano con DP= 11. En *B. japonicum* se determinó que la especie predominante tiene un DP=12 (Figura 1. 7) y además se detectaron especies ramificadas con DP= 13, (con 12 residuos de glucosa en el anillo y uno en la rama), que pueden estar sustituidas con fosfocolina (Rolin et al., 1992).

Por otra parte, el análisis de los espectros 2D HMQC demostraron que el glucano cíclico de *B. loti* con DP= 11, tiene una ramificación y dicha rama está unida al carbono 6 de un residuo de glucosa que forma parte del ciclo. Estos experimentos además demostraron que el glucano cíclico tiene uniones $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$ y una unión $\beta(1-3-6)$, en una proporción 3: 7: 1. El espectro de RMN en un experimento HMBC, estableció que este glucano está formado por un anillo de 10 residuos de glucosa con un único residuo terminal de glucosa que forma la rama. Estudios similares en *B. japonicum* demostraron que el glucano mayoritario producido por dicha cepa está formado por un anillo de 12 glucosas, que puede estar ramificado con un residuo de glucosa y además puede estar sustituida con fosfocolina en uno de los residuos de hexosa que forman el ciclo (Rolin et al., 1992). En este sentido, los glucanos de ambas cepas se diferencian en la cantidad de glucosas que forman el ciclo, que determina el diámetro interno de sus moléculas. También difieren en la presencia de sustituyentes y en la distinta proporción de uniones $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$. Estas diferencias, modifican las propiedades hidrofóbicas de dichas moléculas, las cuales podrían ser relevantes para su interacción con otros compuestos, como flavonoides (Morris et al., 1991). Se ha determinado que los flavonoides de leguminosas tienen la capacidad de formar complejos con glucanos cíclicos y de este manera, se ha sugerido que pueden regular los genes de la nodulación de los rizobios, afectando la formación de nódulos efectivos (Breedveld & Milller, 1994). En este sentido, las diferencias estructurales que se han observado entre los glucanos cíclicos de *B. loti* y *B. japonicum* sugieren que dichos polisacáridos podrían estar

relacionados con la especificidad de cada cepa para la invasión de los nódulos en su hospedante habitual.

Por otra parte, estudios previos sobre la síntesis de glucanos en *Bradyrhizobium* determinaron que la cinética de incorporación de UDPGlc radioactiva a las fracciones insolubles es diferente entre las especies que sintetizan glucanos $\beta(1-2)$ y las que sintetizan glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudió la cinética de síntesis de glucanos en la cepa lenta *B. loti* NZP 2309. Los resultados indican que el comportamiento cinético es similar al reportado en *B. japonicum* (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). La incubación de membranas internas de *B. loti* NZP 2309 con UDP-[^{14}C]Glc, resultó en la formación de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, con una rama formada por residuos de glucosa, similar a los glucanos sintetizados con membranas internas de *B. japonicum* USDA 110 (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993) y a los sintetizados *in vivo* por una mutante *ndvC* de *B. japonicum* (AB-1) (Bhagwat et al., 1999).

Por otra parte, se observó que los productos que se forman durante la síntesis *in vitro* con membranas de la cepa *B. loti* NZP2309 son diferentes dependiendo de la temperatura de incubación. En este sentido, el glucano sintetizado a 30°C tiene uniones $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$ pero con mayor proporción de enlaces $\beta(1-3)$. Así mismo, la síntesis a 10°C originó un compuesto similar al anterior y además otro producto de mayor tamaño que tiene únicamente uniones $\beta(1-3)$.

Por otra parte, el análisis de los productos de la síntesis *in vitro* que son insolubles en TCA, en un gel de poliacrilamida en SDS (Figura 1. 13) sugieren que una proteína de 85 kDa podría estar involucrada en la síntesis de glucanos solubles $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, insolubles $\beta(1-3)$ tipo laminarina, o en la síntesis de ambos compuestos. Estos resultados son similares a los obtenidos con *B. japonicum* USDA 110 (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993). La síntesis de compuestos similares también ha sido estudiada en *A. brasilense*, sin embargo, en dichos estudios no se identificaron proteínas relacionadas con la síntesis de glucanos (Altabe et al., 1994). Por otra parte, se ha sugerido la presencia de una proteína intermediaria en la síntesis de paramylon, un polisacárido insoluble formado por glucosas unidas por enlaces $\beta(1-3)$ en el alga *Euglena gracilis* (Tomos & Northcote, 1978).

Estudios de complementación de una mutante de *S. meliloti* en el gen *ndvB*, con el locus que lleva los genes responsables de la síntesis de glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ de *B. japonicum* (genes *ndvB* y *ndvC* que codifican para una $\beta(1-3)$ glucano sintasa y una putativa $\beta(1-6)$ glucosiltransferasa respectivamente), determinaron que dicha mutante produce un tipo de glucano cíclico con enlaces $\beta(1-3)$, con una rama formada por dos residuos de glucosa (Pfeffer et al., 1996). Estos resultados sugirieron que el locus *ndvC* no se expresa eficientemente en el *background* genético de *S. meliloti* (Bhagwat et al., 1996) y que el producto de este locus controla y/o tiene influencia en la síntesis de enlaces $\beta(1-6)$.

Los resultados presentados en este capítulo de la tesis muestran que las cepas *B. japonicum* USDA 110 y *B. loti* NZP 2309 sintetizan glucanos cíclicos por mecanismos similares, que los mismos están estrechamente relacionados y tienen uniones $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$. Sin embargo, los glucanos formados *in vitro* tienen una estructura diferente a los acumulados *in vivo*. En este sentido, se observó que los glucanos sintetizados *in vitro* tienen mayor proporción de uniones $\beta(1-3)$ mientras que los glucanos acumulados *in vivo* presentan una mayor proporción de uniones $\beta(1-6)$. Es probable que estas diferencias se deban a que la putativa $\beta(1,6)$ glucosiltransferasa no tiene actividad o es inestable en las condiciones experimentales en las cuales se prepararon y purificaron las membranas internas, dado que se ha observado que mutantes de *B. japonicum* en el gen

ndvC que tienen afectada dicha enzima, producen *in vivo* e *in vitro* glucanos similares con mayor proporción de uniones $\beta(1-3)$ que $\beta(1-6)$ (Bhagwat et al., 1996). Otra posibilidad es que el producto del gen *ndvC* codifique para una proteína soluble que no está presente en las preparaciones de membrana interna. Sin embargo, esta última hipótesis sería menos probable dado que el análisis del producto de dicho gen reveló la presencia de potenciales dominios de transmembrana (Bhagwat et al., 1996). Este último dato sugiere que dicha proteína está localizada en la membrana y por ese motivo sería menos probable que fuera una proteína soluble.

Si tenemos en cuenta la estructura de los productos obtenidos de la síntesis *in vitro* y de los compuestos producidos *in vivo* por la cepa lenta NZP 2309 y sumamos las evidencias de trabajos anteriores relacionados con la síntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ en otras especies de *Bradyrhizobium* (Iñón de Iannino & Ugalde, 1993; Bhagwat et al., 1999), se pueden sugerir dos mecanismos probables para la síntesis de los mismos. Uno de ellos involucra la formación de un glucano cíclico con uniones $\beta(1-3)$, al que posteriormente se introducen uniones $\beta(1-6)$ por transglicosilación a través del producto de la proteína NdvC. Este mecanismo podría explicar la formación de glucanos cíclicos con una alta proporción de enlaces $\beta(1-3)$ que se obtuvo por síntesis *in vitro* con membranas internas de la cepa NZP 2309 (figura 1. 12). Asimismo, los resultados obtenidos con mutantes de *B japonicum* nulas en el gen *ndvC*, que producen glucanos cíclicos con uniones $\beta(1-3)$, sugieren la existencia de este posible mecanismo (Bhagwat et al., 1999).

Otro mecanismo probable para la síntesis de estos glucanos, involucra la formación de un glucano lineal con uniones $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ previo a la ciclación. En este sentido, el análisis de los productos extraídos con TCA de la cepa NZP 2309, reveló la presencia de glucanos lineales con uniones $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ con un grado de polimerización mayor que el de los glucanos cíclicos, (compuestos 4 y 5 con DP= 14 y DP =15 respectivamente). Aunque no podemos asegurar si dichos glucanos son productos de degradación o precursores de los glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, este resultado es una evidencia de que este último mecanismo podría ocurrir.

Por otra parte, estudios previos realizados con las cepas *M. loti* NZP 2037 y *M. loti* NZP 2213 determinaron que las mismas producen diferentes polisacáridos de pared que unen flavolanos y establecieron una relación entre tales diferencias y su capacidad para formar nódulos efectivos en distintas especies de *Lotus* (Jones et al., 1987). Las características antes mencionadas, sumado a la escasa información que existe de los glucanos cíclicos en los géneros *Mesorhizobium* que establecen simbiosis especies de *Lotus*, motivaron el estudio de los glucanos cíclicos en dichos rizobios. Los resultados presentados demuestran que las cepas de *M. loti* producen una mezcla de glucanos $\beta(1-2)$ formada por especies neutras y sustituidas con residuos aniónicos. Los estudios preliminares sugieren que la cepa NZP 2213 presenta una mayor proporción de glucanos aniónicos que la cepa NZP 2037. Sin embargo, es necesario continuar con dichos estudios para confirmar tales diferencias.

Por otra parte, se demostró que la síntesis de los mismos se realiza a través de una proteína intermediaria similar a la proteína de 319 kDa de *A. tumefaciens* (Ielpi et al., 1990; Zorreguieta & Ugalde, 1986) y a la reportada en una cepa aislada de *L. glaber* (Lepek et al., 1990) y en otros rizobios de crecimiento rápido (Iñón de Iannino et al., 1996) que producen glucanos cíclicos $\beta(1-2)$. Los ensayos de pulso y caza revelaron que la proteína intermediaria de la cepa NZP 2213 tiene una masa molecular mayor que la identificada en la cepa NZP 2037 (Figura 1. 19).

Los ensayos de nodulación realizados con las cepas *M. loti* NZP 2037, *M. loti* NZP 2213 y *B. loti* NZP 2309 demuestran que las mismas presentan

marcadas diferencias en su capacidad de invasión y establecimiento de nódulos efectivos en especies de *Lotus* (Tabla 1. 2). En este sentido, se quiso establecer si estas diferencias se relacionan con la producción de diferentes tipos de glucanos cíclicos. Los resultados demuestran que la estructura química del glucano producido por dichas cepas no está relacionado con el rango de hospedante ya que dos cepas que producen distinto tipo de glucano (*M. loti* NZP 2037 produce glucanos $\beta(1-2)$, y *B. loti* NZP 2309 produce glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$), forman nódulos efectivos en una misma especie de *Lotus*. Además se determinó que las dos especies de *M. loti* producen glucanos similares con uniones $\beta(1,2)$ y presentan distinto rango de nodulación.

CONCLUSIONES GENERALES

- La cepa *B. loti* NZP 2309 acumula una familia de glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ cíclicos neutros, no sustituidos.
- La especie cíclica mayoritaria producida por la cepa *B. loti* NZP 2309 tiene un DP=11, y está ramificada. Dicho glucano está formado por un anillo de 10 residuos de glucosa con un único residuo terminal que forma la rama. La proporción de enlaces glucosídicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3-6)$ que tiene esta molécula, es 3:7:1 respectivamente.
- Los glucanos cíclicos acumulados por la cepa *B. loti* NZP 2309 y *B. japonicum* USDA 110 están estrechamente relacionados, ya que ambos tienen uniones $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$ en su estructura.
- Los glucanos formados *in vitro* por membranas internas de la cepa *B. loti* NZP 2309, tienen una estructura diferente a los acumulados *in vivo*. En este sentido, los glucanos sintetizados *in vitro* tienen mayor proporción de uniones $\beta(1,3)$ mientras que los glucanos acumulados *in vivo* presentan una mayor proporción de uniones $\beta(1,6)$. Estas diferencias sugieren que el mecanismo de síntesis de este tipo de glucanos se encuentra altamente regulado y que dicha regulación se ve alterada en el sistema de síntesis *in vitro* utilizado.
- En la fracción de membrana interna de *B. loti* se detectó una proteína de 85 kDa que podría estar involucrada en la síntesis de glucanos solubles $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$; insolubles $\beta(1-3)$ tipo laminarina, o de ambos compuestos.
- Nuestros resultados sugieren que la síntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ en *Bradyrhizobium* sp podría involucrar la formación de un glucano cíclico con uniones $\beta(1-3)$, al que posteriormente se introducen uniones $\beta(1-6)$ por transglicosilación, a través de la proteína NdvC.
- Las cepas de *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037 producen glucanos cíclicos con uniones $\beta(1-2)$. Dichos compuestos están formados por especies neutras y sustituidas con residuos aniónicos y son similares a los reportados en rizobios de otros géneros (*Sinorhizobium* y *Rhizobium*).
- La síntesis de glucanos $\beta(1,2)$ cíclicos en las cepas *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037, se lleva a cabo a través de una proteína intermediaria de membrana interna de alto peso molecular, similar a la descrita en otras especies de la subdivisión α de proteobacterias (*A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *R. fredii*, *R. leguminosarum*, *R. loti* y *Brucella abortus*).
- La estructura de los glucanos de las cepas *M. loti* NZP 2213, NZP 2037 y *B. loti* NZP 2309 no está relacionada con el rango de hospedante para la nodulación, ya que dos cepas que producen distinto tipo de glucano, forman nódulos efectivos en una misma especie de *Lotus*. Además, dos cepas que presentan glucanos con el mismo tipo de unión, tienen distinto rango de hospedante.

CAPITULO II: REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO EN BACTERIAS QUE INTERACCIONAN CON PLANTAS

INTRODUCCION

La síntesis de glucógeno y de polisacáridos estructurales (EPS, LPS y glucanos cíclicos) en bacterias, está estrechamente relacionada desde el punto de vista metabólico (sección 2. 2. de la Introducción General). Esta relación está dada por el hecho que existe un origen común para la síntesis de UDPGlc y ADPGlc, los intermediarios de la síntesis de polisacáridos estructurales (LPS, EPS y glucanos cíclicos) y de glucógeno respectivamente. La enzima Pgm utiliza Glc 6P para generar Glc 1P siendo este último producto el precursor común para la síntesis de ambos nucleósidos difosfato azúcares. En este sentido, resulta evidente que existe una partición del carbono disponible, en forma de Glc 6P (vía Glc 1P por la Pgm), para la síntesis de polisacáridos estructurales y de reserva. Numerosos trabajos han establecido la importancia que tiene la síntesis de glucanos cíclicos en bacteriodes durante la nodulación, particularmente durante la invasión de los nódulos (Breedveld & Miller, 1994). Dado que existe una competencia por la utilización de Glc 6P, para la síntesis de los distintos polisacáridos antes mencionados, resulta relevante determinar si el bacteriodes sintetiza glucógeno en el nódulo y en ese caso, que rol desempeña dentro del mismo.

Estudios realizados con una mutante *phaC* de *R. etli*, incapaz de sintetizar PHB, aportan evidencias que sugieren que el glucógeno desempeña un rol importante dentro del nódulo (Cevallos et al., 1996). En este trabajo se observó que dichas mutantes producen altas concentraciones de glucógeno en cultivo y los nódulos formados por las mismas fijan nitrógeno durante más tiempo que los formados por la cepa salvaje (Cevallos et al., 1996). Estos resultados sugieren que el glucógeno acumulado prolonga la supervivencia de los bacteriodes en el nódulo y aporta energía para mantener la fijación de nitrógeno en el tiempo. La supervivencia de los bacteriodes en las últimas etapas de vida del nódulo es un tema que no ha sido aún esclarecido. Trabajos recientes sugieren que los bacteriodes pueden escapar a la degradación y sobrevivir durante la última etapa de vida del nódulo (Müller et al., 1994; Müller et al., 2001). Sin embargo aún se desconoce si los bacteriodes sintetizan y acumulan algún polímero como sustancia de reserva (PHB, glucógeno), para luego utilizarlo en periodos de supervivencia.

La síntesis de glucógeno en bacterias y almidón en plantas está regulada a nivel de la enzima ADPGlc PPasa, que cataliza la conversión de Glc 1P y ATP a ADPGlc y PPi. La regulación de la ADPGlc PPasa está mediada por distintos activadores e inhibidores, dependiendo de la vía principal de asimilación del carbono que utilice el organismo. Estudios con mutantes de la ADPGlc PPasa en bacterias y plantas han determinado que existe una relación directa entre la capacidad de acumular glucógeno y la afinidad de la enzima por los reguladores alostéricos (Ballicora et al., 2003). En general, la mayoría de las ADPGlc PPasas de origen bacteriano son activadas por intermediarios glucolíticos e inhibidas por AMP, ADP y/o Pi, mientras que las enzimas de cianobacterias, algas verdes y plantas superiores son activadas por 3-PGA e inhibidas por Pi (Preiss, 1996).

Dada la importancia que tiene la ADPGlc PPasa en la síntesis de glucógeno y teniendo en cuenta que no existe información sobre esta enzima en rizobios, nos propusimos, identificar los reguladores alostéricos que activan la enzima en los mismos y luego determinar la actividad de la ADPGlc PPasa en nódulos. Los estudios se centraron particularmente en especies de *Bradyrhizobium*, dado que no

existe información acerca de la síntesis de glucógeno en bacterias de este género. Por este motivo, además, nos propusimos obtener información sobre la distribución en el genoma de los genes relacionados con la síntesis de glucógeno en dichos organismos y establecer una comparación con genes homólogos de otras bacterias.

Las ADPGlc PPasas bacterianas se han agrupado en siete clases diferentes según la especificidad de activador que poseen. Sin embargo, solamente se han estudiado en detalle la enzima de *E. coli* y de *Anabaena*, que pertenecen a grupos diferentes de acuerdo a esta clasificación. El activador de la enzima de *E. coli* es Fru 1,6bisP mientras que el de *Anabaena* es 3-PGA (Preiss, 1996). En bacterias que interaccionan con plantas, la única ADPGlc PPasa estudiada hasta el momento es la de *A. tumefaciens* (Uttaro et al., 1998). Esta enzima es activada por Fru 6P y piruvato y representa al grupo IV de esta clasificación.

Estudios previos sugirieron el rol potencial que tienen los residuos de arginina en las diferentes ADPGlc PPasas, formando parte de los sitios de unión de sustratos y efectores aniónicos (Carlson & Preiss, 1982; Iglesias & Preiss, 1992; Sheng & Preiss, 1997; Ball & Preiss, 1992). Posteriormente, se identificaron residuos de arginina en regiones conservadas del extremo N-terminal (Meyer et al., 1999; Gomez Casati et al., 2001).

La comparación de secuencias aminoacídicas de la región N-terminal de distintas ADPGlc PPasas bacterianas, determinó que existe una relación entre la secuencia altamente conservada RRAKPAV (ubicada entre los aminoácidos 32 y 38 de la enzima de *A. tumefaciens*) y el tipo de activador de cada ADPGlc PPasa bacteriana (sección 2.2.2.2.2., Figura 12 de la Introducción General). En particular, la comparación de esta región N-terminal entre las ADPGlc PPasas de rizobios reveló que la región RRAKPAV es idéntica entre estas enzimas y las de *A. tumefaciens* y *R. sphaeroides* (Figura 2.1 de la Introducción de este Capítulo). Aunque aún no se conocen los reguladores alostéricos de las ADPGlc PPasas de rizobios, la relación que se ha establecido entre el tipo de regulador y la secuencia aminoacídica de esta región sugiere que estas enzimas posiblemente estén reguladas por Fru 6P y piruvato como las ADPGlc PPasas de *A. tumefaciens* y *R. sphaeroides*.

Figura 2. 1.- Secuencias N-terminal de distintas ADPGlc PPasas de rizobios. Comparación con las enzimas de *A. tumefaciens* y *R. sphaeroides*.

DAMAYVLAGGRGSRLKELTD	RRAKPAVYFGGKT	RIIDFALS	NALNS	<i>M. loti</i>
DAMAYVLAGGRGSRLKELTD	RRAKPAVYFGGKT	RIIDFALS	NALNS	<i>R. tropici</i>
DAMAYVLAGGRGSRLKELTD	RRAKPAVYFGGKARIIDFALS	NALNS		<i>S. meliloti</i>
DAMAYVLAGGRGSRLKELTD	RRAKPAVYFGGKARIIDFALS	NALNS		<i>A. tumefaciens</i>
QAMAFVLAGGRGSRLKELTD	RRAKPAVYFGGKARIIDFALS	NAMNS		<i>R. sphaeroides</i>

La región RRAKPAV de *A. tumefaciens* está ubicada entre los residuos 32 y 38 de la secuencia primaria de la ADPGlc PPasa.

Por otra parte, experimentos de modificación química revelaron la importancia de los residuos de arginina en la actividad y en la regulación alostérica de las ADPGlc PPasas de *E. coli*, (Carlson, 1982), *R. sphaeroides* (Meyer et al., 1999) y de cianobacterias (Iglesias & Preiss, 1992). Posteriormente, con el clonado y expresión de la ADPGlc Pasa de *A. tumefaciens* (Uttaro et al, 1998), se logró obtener más información acerca del rol de las argininas en el extremo N-terminal. Estudios previos en nuestro laboratorio con mutantes de *A. tumefaciens*, en las que se reemplazó un residuo de arginina por uno de alanina, en distintas posiciones en la

región RRAKPAV, (R32A, R33A y R45A), determinaron que dichas enzimas tenían distinta sensibilidad a la activación por Fru 6P y piruvato (Gomez Casati et al., 2001).

Teniendo en cuenta estos resultados, y la relevancia que presenta la regulación de la ADPGlc Pasa para la síntesis de glucógeno, nos propusimos determinar el rol de residuos específicos de arginina que están altamente conservados en la región N-terminal de las ADPGlc PPasas de rizobios, *A. tumefaciens* y *R. sphaeroides*. Se sabe que dichos residuos están relacionados con la regulación de las ADPGlc PPasas de *A. tumefaciens* y *R. sphaeroides* (Gomez Casati et al., 2001; Meyer et al, 1999). Dada la similitud que presentan las secuencias aminoacídicas de la región N-terminal de las ADPGlc PPasas de las bacterias antes mencionadas, es probable que los residuos de arginina en dicha región desempeñen un rol similar en las distintas enzimas. Por este motivo, se procedió a reemplazar las argininas 32, 33 y 45 de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* por otros residuos aminoacídicos, para analizar el efecto que tiene un cambio de carga, tamaño o hidrofobicidad en estas posiciones. Dado que *A. tumefaciens* pertenece a la familia *Rhizobiaceae* y se encuentra estrechamente relacionada con bacterias que establecen simbiosis mutualistas con leguminosas, los estudios realizados con la enzima de esta especie se pueden tomar como modelo para comprender el mecanismo de activación de otras ADPGlc PPasas que presenten características regulatorias similares.

PARTE EXPERIMENTAL

MM. 1. -Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas *Bradyrhizobium loti* NZP 2309, *B. japonicum* USDA 110 y *Agrobacterium tumefaciens* 348. La cepa *B. loti* NZP 2309 fue cedida por el Dr. Steven Pueppke del Departamento de Patología Vegetal, Universidad de Missouri, Columbia, MO, USA. Las cepas *B. japonicum* USDA 110 y *A. tumefaciens* 348 fueron cedidas por el Dr. Peter Beuselinck de la colección de cultivos de *Rhizobium* del Departamento de Agricultura de Beltsville, MD, USA. Para amplificar los distintos plásmidos se transformaron células competentes preparadas a partir de cultivos de la cepa *Escherichia coli* XL1 Blue cedida por el Dr. Eduardo Zabaleta del IIB-INTECH, Argentina.

MM. 2.- Plásmidos

Se utilizó el plásmido pATUI (construido sobre el plásmido base pKK233 Amp^R) (Uttaro et al. 1998) que tiene clonado el gen *glgC* completo de *A. tumefaciens* 348, que codifica para la enzima ADPGlc PPasa. El gen *glgC* obtenido por digestión de este plásmido con las enzimas *Eco* R I y *Pst* I, se utilizó como sonda en los ensayos de hibridización del ADN genómico de *B. loti* NZP 2309. Para los ensayos de mutagénesis sitio-dirigida se utilizó el vector de expresión pSE420 (Invitrogen), que tiene el gen *glgC* de *A. tumefaciens* subclonado en dicho vector (Gomez Casati et al., 2001). El plásmido pBBR1MCS-4 (Amp^R) fue cedido gentilmente por el Dr. Juan Sanjuán de la Estación Experimental El Zaidín, Granada, España y se utilizó en esta tesis para construir una mini biblioteca de ADN genómico de *B. loti* NZP 2309.

MM. 3.- Condiciones de cultivo

Las cepas de *Bradyrhizobium* fueron cultivadas en medio AMA a pH=7, con agitación, a 28°C. Para la determinación de glucógeno y polihidroxibutirato (PHB), las células de *B. loti* NZP 2309 se crecieron en un medio MM a pH=7, con agitación, a 28°C. La cepa *A. tumefaciens* 348 se cultivó en medio TY a pH=7, con agitación, a 30°C. La cepa *E. coli* XL1 Blue se cultivó en LB a pH=7 con agitación, a 37°C.

MM. 4.- Medios de cultivo utilizados

AMA: 0,5 g/l de K₂HPO₄ ; 0,2 g/l de MgSO₄.7H₂O; 0,2 g/l de NaCl; 10 g/l de manitol y 1 g/l de extracto de levadura.

TY: 5 g/l de triptona y 3 g/l de extracto de levadura.

LB: 10 g/l de triptona; 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl.

Los medios fueron suplementados con 15 g/l de agar y con el antibiótico correspondiente cuando fue necesario, para sembrar las distintas cepas en placas de Petri y obtener colonias aisladas. También se utilizaron picos de flauta para mantener los cultivos de rizobios durante plazos cortos de 3 meses.

MM. 5.- METODOS BIOQUIMICOS

MM. 5. 1.- Medición de actividad de ADPGlc PPasa en nódulos de *Glycine max*

Se extrajeron nódulos de raíces de soja de distintas plantas para cada estadio (17, 27 y 38 días post-inoculación, ver ensayo de nodulación más adelante), hasta obtener aproximadamente 0,2 g de peso fresco. Los nódulos se congelaron en nitrógeno líquido, el tejido se disgregó con un mortero y se preparó un homogenato con 1 ml de solución A (50 mM MOPS pH 7,5; 5 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM DTT) para extraer proteínas de origen vegetal. El extracto se centrifugó a 20000xg por 30 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó como fuente de proteína vegetal.

El precipitado se lavó tres veces (para evitar contaminación de proteínas solubles de origen vegetal antes de romper los bacteroides por sonicación), posteriormente se resuspendió en 1 ml de la solución A con el agregado de PMSF para llegar a una concentración final 2 mM. Luego se sonicó 5 veces durante 30 s para extraer proteínas solubles de los bacteroides. El extracto se centrifugó a 20000xg por 30 min y el sobrenadante se utilizó como fuente de proteína bacteriana.

Para diferenciar las actividades de ADPGlc PPasa de origen vegetal y de origen bacteriano en los extractos de nódulo, se agregó al medio de medida el extracto crudo correspondiente (extracto vegetal o bacteriano) y el activador de las enzimas de plantas (3PGA) o un activador de la enzima bacteriana (Fru 6P). Este último ya se había comprobado que activaba la ADPGlc PPasa en extractos crudos de cultivos discontinuos de *B. japonicum* USDA 110 y también en extractos crudos de *B. loti*, que es una especie estrechamente emparentada con *B. japonicum*. USDA 110.

Para asegurarse de que los cambios en la actividad enzimática en cada caso se debían a cambios ocurridos exclusivamente en el nódulo y no en la raíz, se realizó un esquema de extracción paralelo, similar al anterior, pero con raíces sin nodular. En este caso, en todos los estadios se obtuvieron niveles muy bajos de actividad de la enzima en raíz respecto a la enzima presente en el nódulo. La actividad de la ADPGlc PPasa se determinó en la dirección de pirofosforólisis (ensayo A) tal como se describe a continuación.

MM. 5. 2.- Ensayo de la ADPGlc PPasa

La actividad de la ADPGlc PPasa fue determinada en la dirección de pirofosforólisis (ensayo A) o de síntesis (ensayo B) de ADPGlc. Una unidad (U) de ADPGlc PPasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1 μ mol de ATP o de ADPGlc (dependiendo del ensayo) por min bajo las condiciones especificadas de medida.

Ensayo A. La pirofosforólisis de la ADPGlc fue determinada por el seguimiento de la formación de $[^{32}P]ATP$ a partir de $[^{32}P]PPi$, según se describió previamente (Ghosh & Preiss, 1966; Morell et al., 1987). La mezcla de reacción contenía (si no se especifica otra cosa) 20 μ mol de solución MOPS-KOH (pH 7,5); 50 μ g de BSA cristalina; 1,25 μ mol de NaF; 1,25 μ mol de $MgCl_2$; 0,625 μ mol de ADPGlc, 0,4 μ mol de $[^{32}P]PPi$ ($1,0-4,0 \times 10^6$ cpm μ mol⁻¹) y enzima, en un volumen final de 0,25 ml. La reacción se inició con el agregado de $[^{32}P]PPi$ y luego de 10 min de incubación a 37°C, fue finalizada por el agregado de 3 ml de una solución de TCA 5% (p/v) a 4°C. El $[^{32}P]ATP$ formado se adsorbió hidrofóticamente mediante el agregado de 100 μ l de una suspensión de 15% (p/v) de carbón activado en 100 mM PPi a cada tubo. Posteriormente se centrifugó 1 min a 2500 rpm y se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió 3 veces, con el agregado de TCA 5% (p/v) para lavar adecuadamente el carbón activado. Finalmente, se liberó la marca radioactiva del $[^{32}P]ATP$ unido al carbón activado por hidrólisis, producida por el agregado de 1

ml de HCl 1 M y el calentamiento por 10 min a 100°C en un baño de agua. Luego de enfriar y centrifugar los tubos, el ^{32}P liberado en la hidrólisis se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Ensayo B. La síntesis de [^{14}C]ADPGlc a partir de [^{14}C]Glc1P, fue determinada como se describió previamente (Ghosh H.P. y Preiss J. (1966). La mezcla de reacción contenía (si no se especifica lo contrario) 20 μmol de solución MOPS-KOH (pH 7,5); 50 μg de BSA cristalina; 1 μmol de MgCl_2 ; 0,35 μmol de ATP; 0,1 μmol de [^{14}C]Glc1P ($1,0 \times 10^6$ cpm μmol^{-1}) y 0,3 unidades de pirofosfatasa inorgánica en un volumen final de 0,2 ml. Los ensayos fueron iniciados con el agregado de enzima, incubados 10 min a 37°C y finalizados por calentamiento en un baño de agua a 100°C por 30 s. Luego de enfriar los tubos, se agregó a cada uno 0,6 U de fosfatasa alcalina y se incubó 1 h a 37°C. Se tomaron 100 μl de cada ensayo, se adsorbieron sobre un papel Whatman DE-81, los que posteriormente se lavaron exhaustivamente con agua destilada. La [^{14}C]ADPGlc adsorbida se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Reactivos

El material radiactivo ([^{14}C]Glc1P, [^{14}C]ADPGlc y [^{32}P]PPi) fue comprado en DuPont, New England Nuclear. La Glc1P, ATP, ADPGlc, 3PGA, Fru 6P, Fru 1,6bisP, PPi, pirofosfatasa inorgánica, fosfatasa alcalina, BSA, glucógeno de hígado de conejo, y *Phenyl Agarose* fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Los demás reactivos fueron de la mayor calidad disponible, de grado analítico o similar.

MM. 5. 3.- Purificación parcial de la ADPGlc PPasa de *B. loti* NZ P2309

Se cosecharon 10 g de células a partir de cultivos crecidos en medio AMA hasta fase exponencial tardía con una D.O. 600 nm: 0,8. Las células se resuspendieron en 24 ml de una solución B (50 mM MOPS, pH 7,5, 5% p/v sacarosa, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 y 5 mM DTT). Se agregaron 25 μl de una solución de lisozima 20 mg/ml y se incubó durante 1h a 4°C. La ruptura de las células se realizó por pasaje (3 veces) por una prensa de French. El extracto se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm en rotor SS34, se descartó el precipitado y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo. Sobre éste, se practicó un tratamiento térmico por calentamiento a 55°C durante 5 min. El extracto se centrifugó 15 min a 12000 rpm en rotor SS34 y el sobrenadante se pasó por una columna de *DEAE-Sepharose*, previamente equilibrada con la solución B y la enzima se eluyó de la columna con 3 volúmenes de un gradiente discontinuo preparado con concentraciones crecientes de KCl en el la solución B: 5; 50; 100; 200; 500; 750 y 1000 mM. Las fracciones que tuvieron actividad de ADPGlc PPasa se concentraron 4 veces con un *Centriprep-30* (Amicon, Inc.). La enzima eluyó de la columna con un 200 mM KCl en la solución B. La muestra concentrada se fraccionó en tubos con 10% (v/v) de glicerol y se guardó congelada a -20°C. Todas las etapas de purificación fueron llevadas a cabo a 4°C. Una alícuota de cada etapa fue desalada, usando una columna *P-6 micro Bio-spin* (BioRad) a fin de determinar la actividad enzimática en el sentido de la pirofosforólisis (ensayo A).

MM. 5. 4.- Purificación de las distintas mutantes de ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* expresadas en *E. coli*

Las células de *E. coli* TOP 10 transformadas con el plásmido pSE420 (que tiene clonado el gen *glgC* con una mutación determinada), fueron resuspendidas

(aproximadamente 2 ml de solución por g de células) en una solución C que contenía 50 mM glicilglicina, 5 mM DTT, 1 mM EDTA a pH 7,0 luego sonicadas y el extracto centrifugado a $12000 \times g$ durante 15 min. Al extracto crudo se lo incubó 5 min a 55°C, y luego de enfriar en hielo, se centrifugó nuevamente. Se agregó sulfato de amonio (hasta el 30% de saturación) al sobrenadante del tratamiento térmico, se centrifugó y se descartó el precipitado. El sobrenadante se diluyó 1:2 con solución D (50 mM glicina, 1,23 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 mM DTT, pH 7,5) y se agregó a una columna de *Phenyl-Sepharose* de flujo rápido equilibrada con la misma solución. Luego de lavar con 3 volúmenes de columna con la solución D, se eluyó la enzima con un gradiente de la solución E (50 mM glicina pH 7,5 y 0,5 mM DTT). Las fracciones conteniendo a la ADPGlc PPasa se juntaron, la muestra resultante se diluyó 5 veces en la solución E y posteriormente se adsorbió en una columna *UNO-Q* (BioRad) conectada a un sistema de cromatografía *BioLogic* (BioRad) y equilibrada con la solución E. Luego de lavar la columna con la solución F (50 mM glicina pH 7,5, 0,5 mM DTT, 800 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), la enzima fue eluida con un gradiente lineal que consistió en 20 volúmenes de la solución E en el recipiente de mezcla y 20 volúmenes de la solución F en el de reserva. Las fracciones activas fueron concentradas a 1 mg/ml, desaladas usando solución conteniendo 50 mM glicina pH 7,0; 2 mM MgCl_2 y 0,5 mM DTT, fraccionadas y guardadas a -80°C. La enzima es estable, bajo estas condiciones, alrededor de 3 meses.

Todas las etapas de purificación fueron llevadas a cabo a 4°C. Una alícuota de cada etapa fue desalada en solución 50 mM glicina pH 7,5; 0,5 mM DTT, usando una columna *P-6 micro Bio-spin* (BioRad) a fin de determinar con precisión la actividad enzimática en el sentido de la pirofosforólisis (ensayo A).

MM. 5. 5.- Determinación de los efectores alostéricos de la ADPGlc PPasa de *B. loti* NZP2309

La actividad de la ADPGlc PPasa fue medida en la dirección de pirofosforólisis (ensayo A) utilizando la enzima semipurificada (MM. 5. 3). Se comparó la actividad en presencia y ausencia de cada uno de los siguientes compuestos: piruvato, Fru 6P, Fru 1,6 bisP, ADP, AMP y Pi, para determinar su comportamiento como activadores o inhibidores de la enzima. Se hizo un ensayo comparativo con la enzima purificada de *A. tumefaciens* 348.

MM. 5. 6.- Estudios cinéticos de las mutantes de ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* en la región regulatoria

Se determinó la cinética para los sustratos y efectores alostéricos de las distintas ADPGlc PPasas mutadas. La actividad de las ADPGlc PPasas se determinó por el ensayo B, tal como se describió anteriormente, con las modificaciones que se especifica en cada caso. Los datos experimentales fueron ajustados usando la ecuación de Hill, con un programa de computación desarrollado por Brooks (Brooks, 1992). De esta forma, se calcularon los parámetros cinéticos V_{max} y $S_{0.5}$, $A_{0.5}$ o $I_{0.5}$ (concentración de sustrato, activador e inhibidor que dan el 50% de la actividad, activación máxima o inhibición, respectivamente), así como los coeficientes de Hill (n_H).

MM. 5. 7.- Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína total se dosó por el método de Bradford (Bradford, 1976). La proteína BSA se utilizó como testigo para hacer la curva de calibración.

MM. 6.- ENSAYOS DE INTERACCION PLANTA-BACTERIA

MM. 6. 1.- Material vegetal.

Las semillas de *Glycine max* fueron desinfectadas en superficie con una solución 0,1% p/v de hipoclorito de sodio durante 10 min y luego lavadas sucesivas veces con agua bidestilada estéril. Las semillas desinfectadas se germinaron durante 24 a 48 h en placas de Petri con agar-agua a 25°C, en oscuridad.

MM. 6. 2.- Ensayo de nodulación.

Las plántulas recién germinadas se inocularon cada una con 0,2 ml de un cultivo de *B japonicum* USDA 110 crecido en medio AMA hasta fase exponencial con D.O 600 nm=0,8 y se trasplantaron a jarras de Leonard con vermiculita y medio Jensen (Vincent, 1970) estéril, a pH 7, suplementado con 1 ml de una solución de oligoelementos por cada 1 l de Jensen (solución de oligoelementos: 0,04% p/v Bo; 0,05% p/v Mn; 0,005% p/v Zn; 0,005% p/v Mo; 0,002% p/v Cu) (Vincent, 1970). Las jarras se transfirieron a un cuarto climatizado (23- 25°C) y se mantuvieron con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, el tiempo requerido por el ensayo se regaron con el mismo medio.

MM. 6. 3.- Ensayo de reducción de acetileno

La capacidad de fijación de nitrógeno en los nódulos se determinó por la reducción de acetileno a etileno (Wacek & Brill, 1976) Las raíces de cada planta se colocaron en tubos de 50 ml, se sellaron con tapas de goma y en cada uno se reemplazó 5 ml de aire por 5 ml de acetileno. Los tubos se incubaron a 25°C en oscuridad por 1 h. Se extrajeron muestras de 0,5 ml de cada tubo y se determinó la cantidad de etileno formado por cromatografía gaseosa. Se hicieron 10 repeticiones por estadio. Se utilizaron raíces de plantas sin inocular como control negativo de actividad de nitrogenasa. El ensayo se repitió 3 veces.

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett- Packard 5890-A, equipado con una columna poropack N y un detector de ionización de llama. Las condiciones de corrida fueron: t° del horno = 60°C; t° del inyector = 70°C; t° del detector = 200 °C; flujo de nitrógeno (gas carrier) = 30 ml/min.

MM. 7.- METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

MM. 7. 1.- Purificación de ADN genómico

Se aisló ADN genómico de *B. loti* NZP2309 y de *A. tumefaciens* 348 según el protocolo descrito por Wilson (Wilson,1994). Se partió de 5 ml de un cultivo en fase exponencial, el cual se centrifugó durante 5 min a 11000 rpm en microcentrífuga, para obtener un precipitado. El mismo se resuspendió en 567 ul de una solución de TE (50 mM Tris-Cl, pH:8, 10 mM EDTA). Se agregó 30 ul de una solución 10% (p/v) SDS y 3 ul de una solución 20 ug/ml de proteinasa K, se agitó e incubó durante 1h

a 37°C. Luego se agregaron 100 µl de una solución 5 M NaCl y se agitó vigorosamente, se adicionaron 100 µl de 3% (p/v) CTAB en solución de NaCl, se agitó y luego se incubó durante 10 min a 65 °C. Posteriormente se agregó igual volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (25:1), se mezcló por inversión y se centrifugó 5 min a 14000 rpm. La fase superior se tomó y se pasó a un tubo limpio, en el cual se agregó igual volumen de fenol:cloroformo-álcohol isoamílico (20:20), se agitó y se centrifugó 5 min a 14000 rpm. La fase superior se pasó a un tubo limpio, se agregaron 5 µl de RNasa 10 mg/ml y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente se agregó igual volumen de isopropanol para precipitar el ADN. El precipitado se recuperó centrifugando 15 min a temperatura ambiente y descartando el isopropanol. Luego el ADN se lavó con 70% (v/v) etanol, se centrifugó, se secó y se resuspendió en una solución de TE.

MM. 7. 2.- Purificación de ADN plasmídico

Se centrifugaron 3 ml de un cultivo de *E. coli* XL1 Blue, transformada con el plásmido de interés, durante 5 min a 13000 rpm en microcentrifuga. El precipitado se resuspendió en 200 µl de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, se agregó 300 µl de una solución 0,2 N NaOH con 1% (p/v) SDS, se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Luego se adicionaron 300 µl de una solución 3 M de acetato de sodio, pH 4,8, se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se incubó con 5 µl de RNasa 10 mg/ml, durante 30 min a 37°C. Se agregaron 400 µl de cloroformo, se agitó por inversión y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. la fase superior se pasó a un tubo limpio. Se repitió el paso anterior una vez más, y se agregó 700 µl de isopropanol a la fase superior, se mezcló por inversión y se incubó 25 min. para precipitar el ADN. Se centrifugó 25 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 70 % v/v. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm y el precipitado se secó a temperatura ambiente.

Posteriormente, el ADN se resuspendió en 30 µl de agua miliQ y se agregaron 8 µl de una solución 4 M de NaCl y 40 µl de una solución de PEG 8000 al 13 % (v/v) (preparado en el momento). Se incubó en hielo durante 40 min y se centrifugó 25 min a 13000 rpm. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 400 µl de 70 % (v/v) etanol y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se secó el ADN antes de resuspenderlo en 30 µl de agua milliQ.

MM. 7. 3.- Marcado de sonda por *Random Priming*

Este método consiste en la hibridización del fragmento de ADN a marcar con hexanucleótidos y la posterior utilización de estos últimos como "*primer*" por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Los oligonucleótidos provienen de la digestión parcial de ADN de timo, y están representadas todas las secuencias de bases posibles. Este método rinde sondas de alta actividad específica y permite marcar cantidades pequeñas de ADN. Se utilizó un kit de Promega. Para un volumen final de 100 µl, se mezclaron 25 ng de ADN (gen *glgC* completo de *A. tumefaciens*), 5 µl de una solución de 1 M Tris-HCl, pH 8,0; 20 µl de 5 mM MgCl₂; 2 µl de buffer 0,2 mM Hepes, pH 6,6; 1 µl de una solución diluida 1/10 de hexanucleótidos *random* (150 µg/ml); 4 µl de BSA (400 µg/ml); 2 µl de cada dNTP 20 µM; 5 µl de α ³²P dNTP 3033 nM (3000Ci/mmol) y 1 µl de fragmento Klenow (5U). La mezcla se incubó durante 1h a 30°C.

MM. 7. 4.- Transferencia de ADN a filtros de nylon (southern blot) e hibridización

El gel de agarosa donde se desarrolló la electroforesis se trató durante 30 min con una solución que contenía 0,5 M, NaOH, 1,5 M NaCl, con agitación, con el objeto de desnaturalizar el ADN (gen *glgC* de *A.tumefaciens*). Posteriormente se neutralizó el gel incubando otros 30 min con una solución 1 M Tris-HCl pH 7,2 con 1,5 M NaCl, con agitación constante. El ADN se transfirió a filtros de nylon siguiendo la técnica descrita por Sambrook y col. (Sambrook et al., 1989), utilizando como solución de transferencia SSC 20x (3 M NaCl, 0,3 M citrato de sodio). Los filtros se calentaron a 80°C y el ADN se fijó a la membrana por irradiación UV durante 3 min.

La prehibridización se llevó a cabo en un horno a 65°C durante 2 h, usando una solución 6x SSC, 5x Denhardt, SDS 0,5% (p/v) y 100 ug/ml de ADN de esperma de salmón (previamente calentado 5 min a 95°C y mantenido en hielo). Preparación de 500 ml de 50x Denhardt: 5 g de Ficoll, 5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de albúmina bovina sérica y se lleva a 500 ml con agua bidestilada.

La hibridización se realizó, agregando a la solución anterior, la sonda marcada con ³²P en la posición α, previamente calentada a 95°C durante 5 min. El filtro se dejó hibridizando aprox. 20 h con agitación, a 65°C. Luego, la membrana hibridada se lavó 3 veces durante 15 min con una solución 1x SSC y 0,1% (p/v) SDS a 45°C y 3 veces con una solución 0,1x SSC y 1% (p/v) SDS a 65°C. El filtro húmedo se cubrió con un filme plástico y se expuso a -70°C con una placa de X-Omat (Kodak) el tiempo requerido de acuerdo al ensayo.

MM. 7. 5.- Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizó la técnica descrita anteriormente (Sambrook et al., 1989). Se realizaron electroforesis horizontales, en una solución de corrida TBE 0,5x (TBE 50x: 0,45 M H₃BO₃-Tris; 10 mM EDTA). La agarosa se utilizó en concentraciones de 0,7 a 1% (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, adicionada con 1 ug/ml de bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular "1Kb ladder" (Promega), para estimar el tamaño de los fragmentos que se analizaron.

MM. 7. 6.- Obtención de una mini-biblioteca de ADN genómico de *B. loti* NZP2309

El ADN genómico se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y el producto de la digestión se sembró en dos calles de un gel de agarosa. Los fragmentos de distinto tamaño se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de una de las calles, se transfirieron a un filtro de nylon (Hybond N+, Amersham-Pharmacia), y se hibridizaron con una sonda del gen *glgC* de *A. tumefaciens* 348, marcada con ³²P, como se describió anteriormente. La membrana hibridizada se expuso en una placa de rayos X (Kodak), a -70°C y luego del revelado se detectó una banda que corresponde a un fragmento de 4,5 kb. Una vez conocido el tamaño de los fragmentos que forman un híbrido con la sonda en el experimento de *southern blot*, los fragmentos correspondientes que estaban presentes en la otra calle del gel de agarosa que se sembró paralelamente, se aislaron y purificaron según la metodología comprendida en el reactivo analítico *DNA Gel purification GFX*, de Amersham, Pharmacia. Posteriormente, dichos fragmentos se ligaron a pBBRMCS-

4 previamente digerido con *EcoR* I, con 1 unidad Weiss de ligasa T4, en una solución que tenía 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1 mM ATP, 7 mM Mg Cl₂, 1 mM DTT, en un volumen final de 10 ul. La mezcla de ligación se incubó a 25°C, durante 16h. Se transformaron 100 ul de células competentes con el producto de la ligación, por el método de golpe térmico (Sambrook et al., 1989). Las células transformadas se incubaron durante 1h a 37°C y se sembraron en placas con medio LB con 100 ug/ml de ampicilina. Luego de 24 h de incubación a 37°C se seleccionaron las colonias blancas que contenían el plásmido con fragmentos de ADN genómico de *B. loti*.

MM. 7. 7.- Identificación de una región que contiene el gen *glgC* en *B. loti* por Dot Blot

Se extrajo ADN plasmídico de cada colonia blanca seleccionada y se fijó dicho ADN en un filtro de nylon (Hybond N+, Amersham-Pharmacia), siguiendo la técnica descripta por Sambrook y col. (Sambrook et al., 1989). El ADN presente en el filtro se sometió al mismo tratamiento mencionado previamente en la sección MM.7. 4, utilizando la misma sonda radioactiva, para identificar los clones que tenían homología con el gen *glgC* de *A. tumefaciens*.

De los 70 clones analizados, se detectó un clon positivo, el cual se secuenció desde ambos extremos del sitio de policlonado del plásmido, para comprobar que tuviera el gen *glgC* de *B. loti*. La secuencia completa del fragmento se obtuvo por colaboración con el Prof. Jack Preiss, en la DNA Sequencing Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, USA.

Las secuencias de los genes presentes en el fragmento clonado se compararon con otros genes relacionados presentes en diferentes bacterias y se determinó el porcentaje de homología e identidad con dichos genes y de los productos de dichos genes usando la base de datos del programa Blastn y Blast P (Altschul, S.F., 1997).

MM. 7. 8.- Mutagénesis sitio-dirigida de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens*

Los estudios de mutagénesis sitio-dirigida fueron realizados en colaboración con el laboratorio del Dr Christopher R. Meyer, en el Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Fullerton, California, usando la técnica *Quikchange* (Stratagene). Se diseñaron pares de oligonucleótidos conteniendo la mutación deseada (y sus complementarios) y se llevaron a cabo reacciones de PCR usando como molde el plásmido pSE420, a fin de elongar la totalidad del vector. Posteriormente, se incubó el producto de PCR con *Dpn* I, enzima que digiere específicamente DNA metilado (parental). Luego de 1 h de incubación, se transformaron células de *E. coli* TOP 10 con el producto remanente luego de la digestión con *Dpn*I. Las células transformadas se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en LB-agar-ampicilina. Para verificar si se produjo el cambio correcto de residuo aminoacídico, se procedió a secuenciar la región del gen *glgC* donde se debía encontrar la mutación deseada en cada caso. Los clones que efectivamente poseían la mutación, se usaron para la expresión de las ADPGlc PPasas modificadas. Los oligonucleótidos usados para la conversión de arginina a los distintos aminoácidos (alanina, serina, lisina, ácido glutámico, glutamina y leucina) en la región N-terminal, son mostrados a continuación (se muestran solamente los oligonucleótidos correspondientes 5'-3' y en negrita y subrayadas las bases nitrogenadas cambiadas en cada caso):

WT	5'- GAA CTG ACG GAC CGC CGG GCA AAA CCC -3'
R32A	5'- GAA CTG ACG GAC GCC CGG GCA AAA CCC -3'
R32L	5'- GAA CTG ACG GAC CTG CGG CAA AAA CCC -3'
R32K	5'- GAA CTG ACG GAC AAA CGG CAA AAA CCC -3'
R32Q	5'- GAA CTG ACG GAC CAG CGG CAA AAA CCC -3'
R32E	5'- GAA CTG ACG GAC GAG CGG CAA AAA CCC -3'
R32S	5'- GAA CTG ACG GAC TCG CGG CAA AAA CCC -3'
WT	5'- CTG ACG GAC CGC CGG GCA AAA CCC GCG GTT -3'
R33A	5'- CTG ACG GAC CGC GCC GCA AAA CCC GCG GTT -3'
R33K	5'- CTG ACG GAC CGC AAG GCA AAA CCC GCG GTT -3'
R33Q	5'- CTG ACG GAC CGC CAA GCA AAA CCC GCG GTT -3'
R33E	5'- CTG ACG GAC CGC GAG GCA AAA CCC GCG GTT -3'
R33S	5'- CTG ACG GAC CGC TCT GCA AAA CCC GCG GTT -3'
WT	5'- GGC GGC AAG GCG CGC ATC ATC GAT TTT-3'
R45A	5'- GGC GGC AAG GCG GCC ATC ATC GAT TTT-3'
R45L	5'- GGC GGC AAG GCG TTA ATC ATC GAT TTT-3'
R45K	5'- GGC GGC AAG GCG AAG ATC ATC GAT TTT-3'
R45Q	5'- GGC GGC AAG GCG CAA ATC ATC GAT TTT-3'
R45E	5'- GGC GGC AAG GCG TTA ATC ATC GAT TTT-3'

La confirmación de la secuencia de ácidos nucleicos de cada construcción se realizó usando el equipo *Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit* (USB Co.) que utiliza dideoxinucleótidos marcados radioactivamente ([α -³³P]ddNTP), siguiendo las indicaciones del fabricante.

R. 1.- - ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN Y LA SECUENCIA DE GENES RELACIONADOS CON LA SÍNTESIS EN *BRADYRHIZOBIUM LOTI*. COMPARACIÓN DE LOS MISMOS CON LOS DE OTROS RIZOBIOS.

R. 1. 1.- Clonado y caracterización de una región que codifica para los genes *glgC* y *glgA* de *B. loti* NZP2309

Para identificar el gen *glgC* de *B. loti*, el ADN genómico purificado (sección MM. 7. 1) fue digerido con la enzima de restricción *EcoR* I y sembrado en un gel de agarosa (sección MM. 7. 6). En dicho gel también se sembraron los productos de la digestión del ADN genómico de *A. tumefaciens* y el gen *glgC* de *A. tumefaciens*, obtenido por digestión del plásmido pATUI con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Pst* I.

Los distintos fragmentos se separaron por electroforesis (sección MM. 7. 5) y se sometieron a una hibridización con una sonda radioactiva del gen *glgC* completo de *A. tumefaciens* (secciones MM. 7. 5, MM. 7. 4 y MM. 7. 3). Los fragmentos de ADN de *B. loti* que hibridaron con la sonda (Figura 2. 2) se purificaron del gel y se clonaron en el vector pBBRMCS-4 como se describe en la sección MM. 7. 6.

Con los distintos clones obtenidos, se realizó un dot blot (MM. 7. 7) con la misma sonda utilizada anteriormente y se identificó un clon positivo (Figura 2. 3).

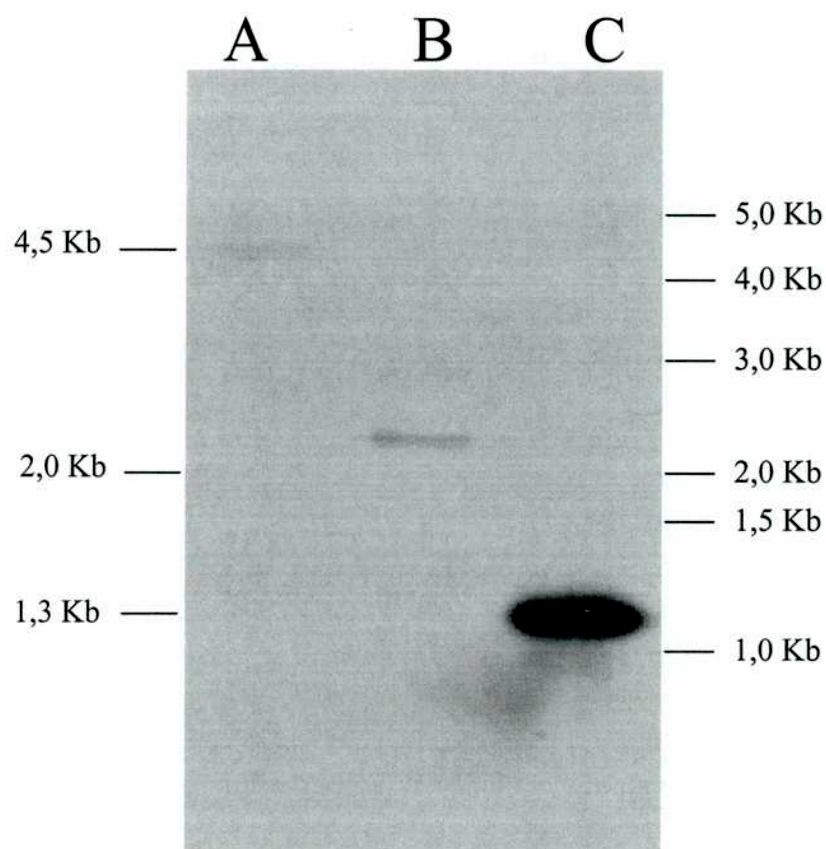


Figura 2. 2.- Southern blot de ADN genómico de *B.loti* digerido con *Eco* R I. Referencias : calle A : ADN de *B. loti* digerido con *Eco* R I, calle B: ADN genómico de *A.tumefaciens* digerido con *Eco* R I, C: gen *glgC* de *A.tumefaciens*; a la derecha del *southern blot* se muestra la ubicación de algunas bandas correspondientes a los marcadores de peso molecular "1Kb DNA ladder" (Promega) sembrados en el gel de agarosa. Para la hibridización, se utilizó una sonda radioactiva del gen *glgC* de *A.tumefaciens* (sección MM. 7. 3).

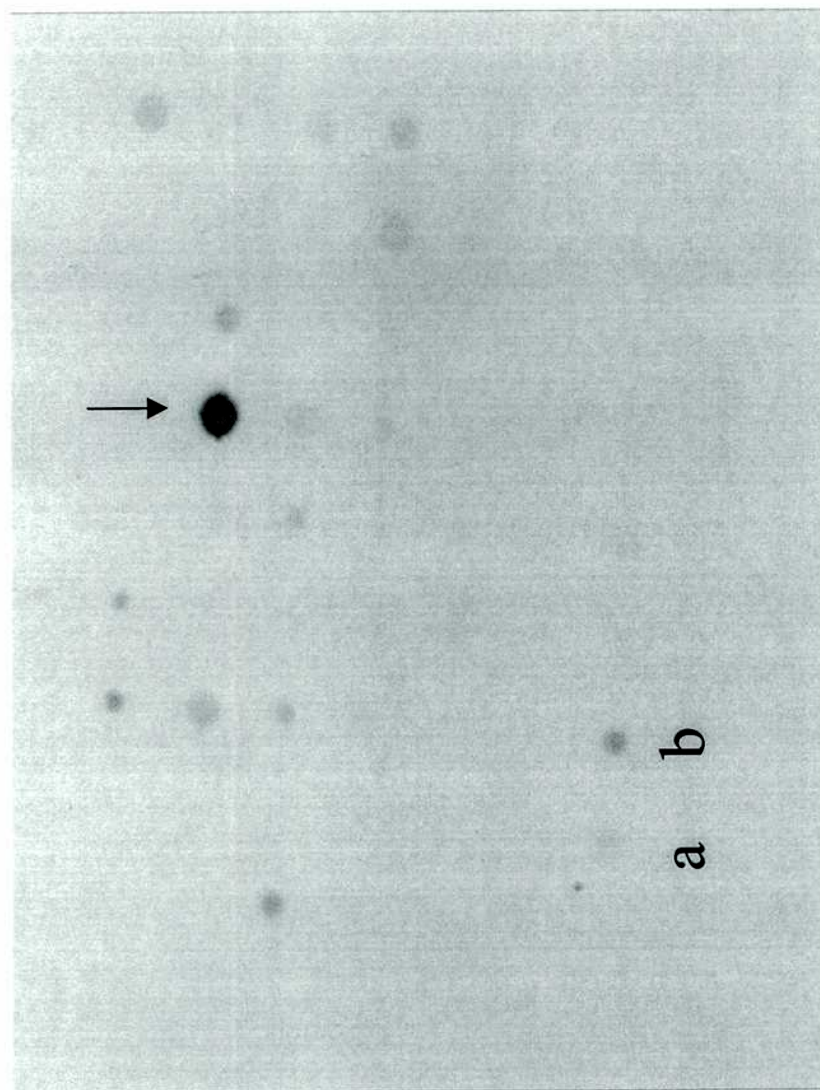


Figura 2. 3.- Hibridización de ADN plasmídico (pBBRMCS-4 que lleva fragmentos Eco RI de 4,4 Kb de ADN de *B. loti* (sección MM.7.7)) con una sonda del gen *glgC* de *A. tumefaciens*, para identificar plásmidos que tuvieran fragmentos de *B. loti* con homología al gen *glgC*. La flecha muestra un clon positivo. a: ADN de pBBRMCS-4 sin inserto. b: ADN genómico de *B. loti*

La secuencia nucleotídica del fragmento clonado (fragmento *Eco* RI de 4,44 Kb) en el clon positivo, se comparó con un banco de secuencias conocidas utilizando el programa Blast-x (Altschul et al., 1997) y se identificó una región que presenta homología con genes *glgC* bacterianos que codifican para LA enzima ADPGlc PPasa. Esta secuencia corresponde a las primeras 1095 pb del fragmento, comenzando desde el sitio de clonado *Eco* R I, con el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1095 (Figura 2. 8). En esta secuencia faltan 180 nucleótidos del extremo 5' que corresponden a los primeros 60 aminoácidos del producto del gen *glgC*. Corriente abajo de este gen, se identificó un marco de lectura abierto de 1461 pb que presenta homología con el gen *glgA* de bacterias (Figuras 2. 4 y 2. 8). Este fragmento contiene el gen *glgA* completo que codifica para la enzima glucógeno sintasa (GS), desde el nucleótido 1095 hasta el nucleótido 2556. Corriente abajo de este gen, se secuenciaron los 1880 nucleótidos restantes y, contrariamente a lo que se observa en otras bacterias, esta región no tiene homología con genes relacionados con el metabolismo del glucógeno (Figuras 2. 4 y 2. 8). En este fragmento se encontró un marco de lectura abierto de 257 pb que codifica para una proteína que presenta un 74% de homología con la proteína PBRS 6460 de *B. japonicum*, con 142 aminoácidos, cuya función es desconocida.

Corriente abajo del gen que codifica para esta proteína, se encontró otro marco de lectura abierto con 300 pb, que codifica para una proteína homóloga a la proteína BLR 7496 de *B. japonicum*, que está relacionada con la fijación de nitrógeno (Figuras 2. 4 y 2. 8).

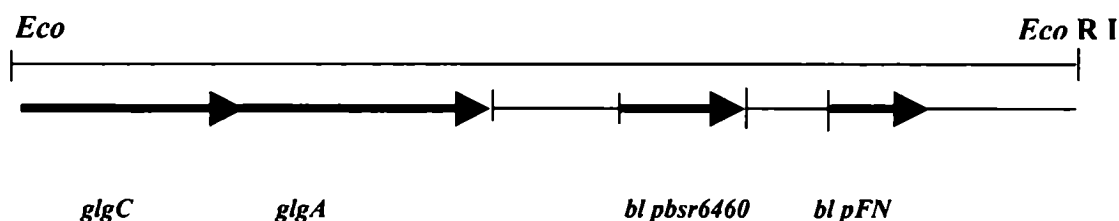


Figura 2. 4.- Esquema de la organización de los genes presentes en el fragmento *Eco* R I de 4,4 kb de ADN genómico de *B. loti*, clonado en el vector pBBRMCS-4. *glgC*: gen que codifica para la proteína ADPGlc PPasa; *glgA*, gen que codifica para la proteína glucógeno sintasa; *bl pbsr6460*, gen que codifica para una proteína homóloga a proteína pbsr 6460 de *B. japonicum* de función desconocida; *bl pFN*, gen que codifica para una proteína homóloga a proteína pFN de *B. japonicum* que está relacionada con la fijación de nitrógeno.

Posteriormente al clonado de este fragmento, se publicó la secuencia completa del genoma de *B. japonicum* en el GenBank (Kaneko et al., 2002 a y b) y se pudo conocer la secuencia y organización de los genes del metabolismo de glucógeno en el genoma de esta especie. El análisis del genoma de *B. japonicum* reveló que dichos genes no están organizados en un operón como se observó en la mayoría de las bacterias (Figura 2. 5). Los genes de la síntesis y degradación del glucógeno están separados entre sí por cientos de bases (Figura 2. 5). Se identificó una única copia del gen *glgC*, dos genes *glgA* (*glgA1* y *glgA2*), y una copia de los genes *glgB*, *glgP* y *glgX*. La comparación de la región clonada de *B. loti* con el genoma de *B. japonicum* reveló que existe un alto grado de homología entre ambas especies, en la secuencia nucleotídica y organización de los genes *glgC*, *glgA* y los genes situados corriente abajo del gen *glgA* que no están relacionados con el metabolismo del glucógeno. Los genes *glgC* y *glgA* de *B. loti* tienen un 92 y 85% de homología con el gen *glgC* y el gen *glgA1* de *B. japonicum*, respectivamente, los cuales están agrupados en el genoma (Figura 2. 5). El gen *glgA2* de esta especie está distanciado del par *glgC*-*glgA1*, aproximadamente 4 Mb corriente arriba en el genoma y tiene un 40 % de homología con el gen *glgA1* de *B. japonicum* y con el gen *glgA* de *B. loti* (Figura 2. 5). Por otra parte, los genes *glgB* y *glgX* están agrupados en el genoma y se localizan aproximadamente a 400 kb corriente abajo del par *glgC*-*glgA1* (Figura 2. 5). Por último, el gen *glgP* se encuentra a 1,4 Mb corriente abajo del gen *glgX* (Figura 2. 5). Además, se identificó el gen *celB* que codifica para una fosfoglucomutasa. En las bacterias que interaccionan con plantas, este gen se encuentra formando parte del operón glucógeno (Uttaro et al., 1998; Galibert et al., 2001; Lepek et al., 2002), sin embargo, en el genoma de *B. japonicum*, dicho gen se encuentra corriente arriba del gen *glgA2*, a una distancia de 400 Kb aproximadamente (Figura 2. 5).

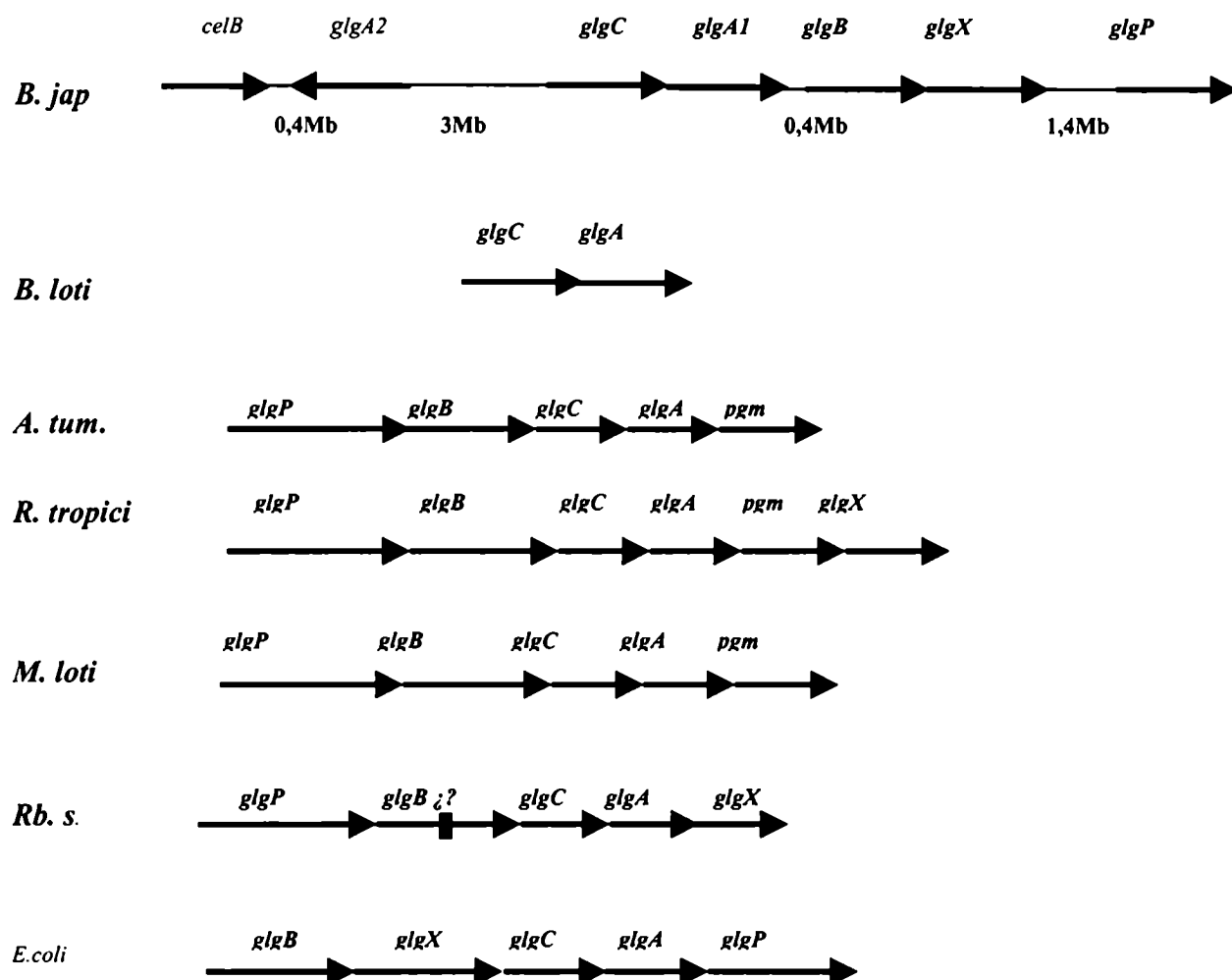


Figura 2. 5.- Esquema de la organización de los genes estructurales del metabolismo del glucógeno en bacterias. *B.japonicum* (*B.jap*); *B.loti*; *A. tumefaciens* (*Ag.t*) ; *R.tropici*; *M. loti* ; *Rhodobacter sphaeroides* (*Rb.s.*); *E.coli* . Genes : *glgP*, glucógeno fosforilasa; *glgB*, enzima ramificante; *glgC*, ADPGlucosa pirofosforilasa; *glgA*, glucógeno sintasa; *glgX*, enzima desramificante; *pgm* o *celB*, fosfoglucomutasa; Distancias entre genes: 3 Mb:3000.000 bases; 0,4 Mb: 400.000 bases; .1,4 Mb: 1.400.000 bases

R. 1. 2.- Análisis de las secuencias aminoacídicas que codifican para las proteínas GlgC (ADPGlc PPasa) y GlgA (GS)

Para establecer el grado de homología de la ADPGlc PPasa de *B. loti* con otras ADPGlc PPasas bacterianas ya descritas, se realizó un alineamiento de las distintas secuencias aminoacídicas en el programa DNASTar (Lasergene) utilizando el algoritmo Clusta-W (Tabla 2. 1). El análisis determinó que la proteína GlgC de *B. loti* está más relacionada con la ADPGlc PPasa de *B. japonicum* (Kaneko et al., 2002 a y b) y menos relacionada con ADPGlc PPasas de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* tales como *R. tropici*, *A. tumefaciens* (Uttaro et al., 1998), *S. meliloti* (Galibert et al., 2001) y *M. loti* (Lepek et al., 2002). Por otra parte, las mayores diferencias se encontraron con las ADPGlc PPasas de *R. sphaeroides* (Igarashi & Meyer, 2000) y *E. coli* (Preiss, 1989) (Tabla 2. 1).

Tabla 2. 1.- Grado de homología de las diferentes ADPGlc PPasas y GS bacterianas respecto de las enzimas homólogas de *B. loti*

bacteria	% de identidad en la secuencia aminoacídica	
	ADPGlc PPasa	GS
<i>B. japonicum</i>	95,5	87,3 (1) 37,4 (2)
<i>R. tropici</i>	74,5	46,5
<i>S. meliloti</i>	73,1	49,6
<i>M. loti</i>	72,8	48,4
<i>A. tumefaciens</i>	72,8	47,7
<i>R. sphaeroides</i>	65,1	44,3
<i>E. coli</i>	55,5	44,7
<i>R. rubrum</i>	54,7	44,7

Tal como se mencionó en la Introducción de la tesis, la región N-terminal de esta proteína es muy importante para la regulación alostérica. Particularmente la región KRAKPAV (residuos 39- 45 en la enzima de *E. coli*), se demostró que es importante para la unión del activador Fru-1,6 bisP de *E. coli* y también para otras ADPGlc PPasas (Preiss, 1996; Preiss, 1989; Greene, 1996; Meyer, 1993; Gomez Casati et al., 2001). En la enzima de *B. loti* dicha región no se pudo identificar dado que no se logró clonar la secuencia completa y faltan 60 aminoácidos de la región N-terminal, donde está ubicada la secuencia homóloga a RRAKPAV. De todas maneras, el alineamiento de la región N-terminal de las ADPGlc PPasas que provienen de bacterias que interaccionan con plantas (rizobios, *A. tumefaciens*) reveló que la secuencia homóloga a RRAKPAV en dichas bacterias es idéntica (Figura 2. 1 de la Introducción de este Capítulo). Teniendo en cuenta que dicha secuencia está altamente conservada en los rizobios, es probable que también esté conservada en la enzima de *B. loti*.

Analizando otras regiones de la estructura primaria de la ADPGlc PPasas de *B. loti*, se encontró que la misma presenta similitud con otras ADPGlc PPasas, en una región conservada cerca de la tirosina-114 de *E. coli* asociada a la unión del

sustrato ATP (región GTADV) (Preiss, 1989), excepto por un cambio de un residuo V por I (aminoácidos 54-59, GTADI en la secuencia de *B. loti*), similar al encontrado en la proteína de *B. japonicum* (Figura 2. 6).

También se encontró similitud con otras ADPGlc PPasas en una región involucrada en la unión a Glc1-P (Preiss, 1996; Preiss & Romeo, 1989) (aminoácidos 132-134, EKP en la secuencia de *B. loti*) (Figura 2. 6). Existen otras posiciones que son importantes para la regulación de la enzima por azúcares-fosfato como la prolina 295 y la glicina 336 (posición 295 y 336 respectivamente para la enzima de *E. coli*) (Iragashi & Meyer, 2000). Ambas posiciones están conservadas también en la enzima de *B. loti*. (Figura 2. 6).

Por otra parte, las 1461 bases contiguas al gen *glgC* corresponden al gen *glgA* completo de *B. loti* y codifican para una proteína de 487 aminoácidos que presentó homología con la GS de otras bacterias. Esta proteína tiene una masa molecular teórica de 52,383 kDa, determinada de acuerdo a la composición de aminoácidos que presenta y es levemente mayor a la reportada de las dos GS de *B. japonicum* (482 aa y 463 aa) y a otras GS de origen bacteriano.

Para comparar el grado de homología que tiene la GS de *B. loti* con otras GS de origen bacteriano, se realizó un alineamiento de las distintas secuencias con el programa DNASTAR (Lasergene), utilizando el algoritmo Clusta-W (Tabla 2. 1). La comparación de las distintas secuencias determinó que la enzima GS de *B. loti* presenta mayor homología con la GS 1 de *B. japonicum*, cuyo gen está ligado al gen *glgC* en el genoma (Tabla 2. 1). Luego, en orden decreciente de homología, se encuentran las GS de *S. meliloti*, *M. loti*, *A. tumefaciens*, *R. tropici*, *E. coli*, *R. sphaeroides* y *R. rubrum* (Tabla 2. 1).

Por otra parte, se observó que la enzima de *B. loti* comparte con las demás GS una región altamente conservada entre los aminoácidos 18 y 21 (KTGGL) (Figura 2. 7). Se demostró que esta región en *E. coli* está involucrada en la unión del sustrato ADPGlc (Furukawa et al., 1993). Esta región está ausente en la GS2 de *B. japonicum*, que presenta menos homología con las otras GS bacterianas. Por otra parte, dos regiones adicionales de función desconocida están también muy conservadas entre las distintas GS y se denominan región I y región II (Preiss, 1996). Ambas regiones se encuentran en la enzima de *B. loti*, y están ubicadas entre los aminoácidos 378-388 (PSRFEPCLTQ) y 403-409 (VGGLEDTI) respectivamente. La región I está altamente conservada pero la región II presenta diferencias en tres aminoácidos cuando se comparan con las secuencias homólogas analizadas. Además, es interesante la observación de que la enzima de *B. loti* presenta una lisina en la posición 283 que es homóloga a la lisina 277 en la enzima de *E. coli*, ya que se demostró que esta última está involucrada en la catálisis (Furukawa et al., 1994) (Figura 2. 7). Este residuo está conservado también en la enzima de *A. tumefaciens* y *Rb. rubrum* pero está reemplazado por arginina en las enzimas de *R. sphaeroides*, *M. loti*, *R. tropici* y *S. meliloti* (Figura 2. 7).

Figura 2. 6.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las ADPGlc PPasas bacterianas



Figura 2. 7.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de distintas GS bacterianas

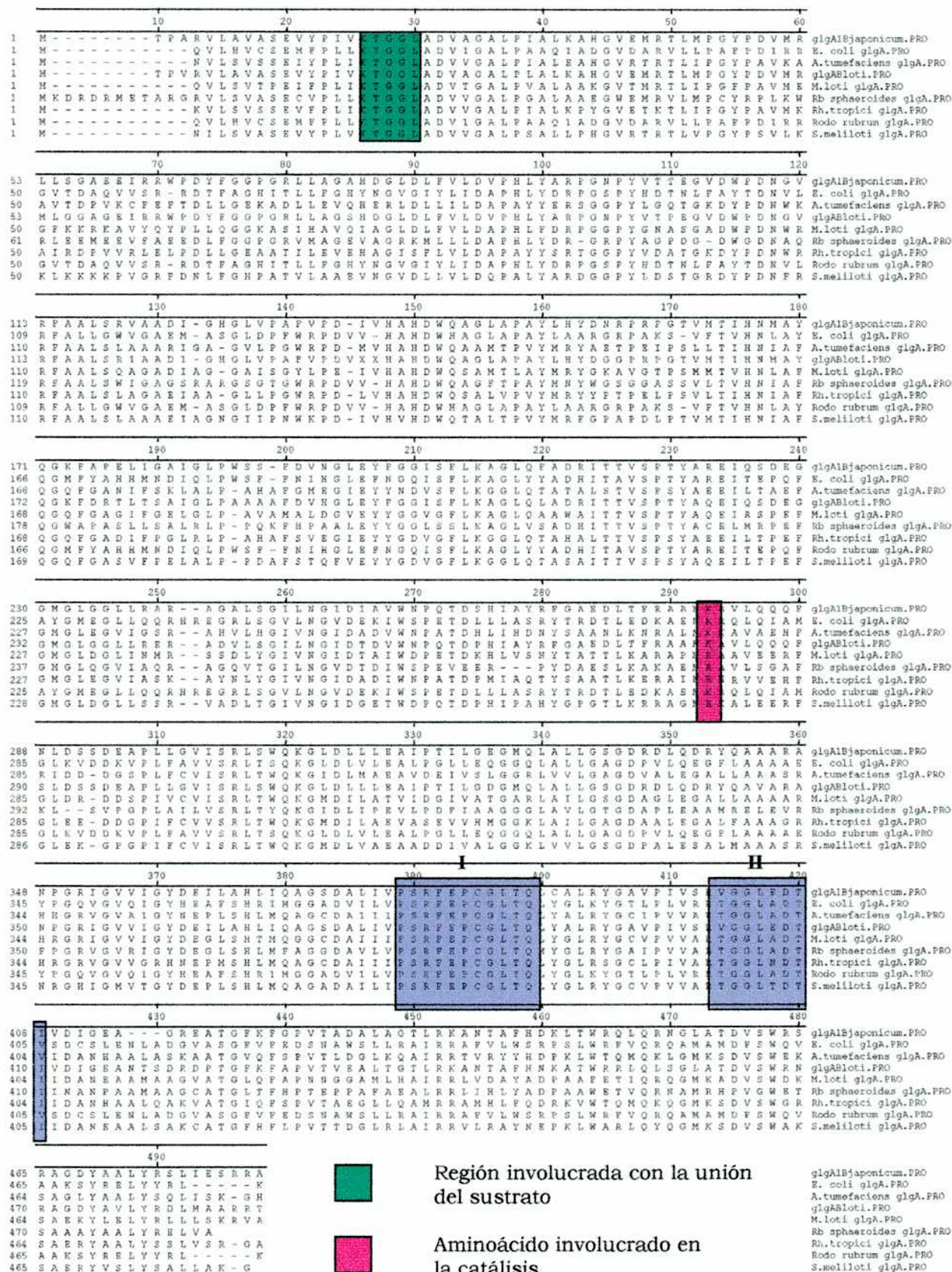


Figura 2.8. Secuencia nucleotídica de fragmento *EcoR* I de ADN genómico de *B. loti* NZP 2309, clonado en el vector pBBR1MCS-4.

EcoRI
|

```

1  TTGCGGCCGCTCTCCACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCATCCGCCGGAT 60
   AACGCCGCGGAGAGGTGATCACCTAGGGGGCCGACGTCCTTAAGGCCGTAGCCGGCCTA

a  L R P L S T S G S P G L Q E F R H P P D -
b  C G R S P L V D P P G C R N S G I R R I -
c  A A A L H * W I P R A A G I P A S A G * -

AGCGGTGCGGACCCAGTACAAGGCGCACAGCCTGATCCGGCACCTTCAGATGGGCTGGAA
61  TCGCCAGCGCTGGGTCATGTTCCGCGTGTCCGACTAGGCCGTGGAAGTCTACCCGACCTT 120

a  S G R D P V Q G A Q P D P A P S D G L E -
b  A V A T Q Y K A H S L I R H L Q M G W N -
c  R S R P S T R R T A * S G T F R W A G T -

CTTCTTCCGCCCCGAACGCAACGAGAGCTTTGACATCCTCCCGGCCAGTCAGCGCGTCTC
121  GAAGAAGGCGGGGCTTGCGTTGCTCTCGAACTGTAGGAGGGCCGGTCAGTCGCGCAGAG 180

a  L L P P R T Q R E L * H P P G Q S A R L -
b  F F R P E R N E S F D I L P A S Q R V S -
c  S S A P N A T R A L T S S R P V S A S R -

GGAGAACATGTGGTATGTGCGGCACGGCGGATGCGATCTATCAGAACATCGACATCATCGA
181  CCTCTGTACACCATAACAGCCGTGCCGCCTACGCTAGATAGTCTTGTAGCTGTAGTAGCT 240

a  G E H V V C R H G G C D L S E H R H H R -
b  E N M W Y V G T A D A I Y Q N I D I I E -
c  R T C G M S A R R M R S I R T S T S S S -

GTCGCACAACGCACGCTTCATCGTCGTGCTCGCCGGCGATCACATCTACAAGATGGACTA
241  CAGCGTGTGCGTGCGAAGTAGCAGCACGAGCGCCGCTAGTGTAGATGTTCTACCTGAT 300

a  V A Q R T L H R R A R R R S H L Q D G L -
b  S H N A R F I V V L A G D H I Y K M D Y -
c  R T T H A S S S C S P A I T S T R W T T -

CGAGGTGATGTGCGCCAGCATGTGACAGCGCGCGGACGTCACCGTCGGCTGCCTCGA
301  GCTCCACTACGACGCGGTGCTACAGCTGTGCGCGCGGCTGCAGTGGCAGCCGACGGAGCT 360

a  R G D A A P A C R Q R R R R H R R L P R -
b  E V M L R Q H V D S G A D V T V G C L E -
c  R * C C A S M S T A A P T S P S A A S R -

GATGCCGCGCGCGGAATCTTCCGGCTTCGGCATCATGCATGTGACGAGAACGGCTGGAT
361  CTACGGCGCGCGCCTTAGAAGGCCGAAGCCGTAGTACGTACAGCTGCTCTTGCCGACCTA 420

a  D A A R G I F R L R H H A C R R E R L D -
b  M P R A E S S G F G I M H V D E N G W I -
c  C R A R N L P A S A S C M S T R T A G S -

CCAGCAGTTCCTGGAGAAGCCGGCCGATCCGCCGCCGATGCCGGGCAAGCCAGACGTCTC
421  GGTCGTCAAGGACCTCTTCGGCCGGCTAGGCGGGCTACGGCCCGTTGCGTCTGCAGAG 480

a  P A V P G E A G R S A A D A G Q A R R L -
b  Q Q F L E K P A D P P P M P G K P D V S -
c  S S S W R S R P I R R R C R A S Q T S R -

GCTCGCCAGCATGGGCATCTACGTGTTGATAACGAAATTCCTGTTGACACAGCTCAAGCG
481  CGAGCGGTGCTACCCGTAGATGCACAAGCTATGCTTTAAGGACAAGCTGGTCGAGTTCGC 540

```

a A R Q H G H L R V R Y E I P V R P A Q A -
b L A S M G I Y V F D T K F L F D Q L K R -
c S P A W A S T C S I R N S C S T S S S A -

CGACGCCGAGGATACGAACTCCAGTCACGATTCGCGCAAGGACATCATCCCCTATATCGT
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
GCTGCGGCTCCTATGCTTGAGGTCAGTGCTAAAGCCGTTCTGTAGTAGGGGATATAGCA

a R R R G Y E L Q S R F R Q G H H P L Y R -
b D A E D T N S S H D F G K D I I P Y I V -
c T P R I R T P V T I S A R T S S P I S S -

CAAGAACGGCGGCCATCGCGCATCAATTCTCGACCTCGTGCGTACGCTCGGGCAGCGA
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
GTTCTTGCGGCGCGGTAGCGCTAGTTAAGAGCTGGAGCACGCATGCGAGCCCGTCGCT

a Q E R P R H R A S I L D L V R T L G Q R -
b K N G R A I A H Q F S T S C V R S G S D -
c R T A A P S R I N S R P R A Y A R A A I -

TCCCCGCGCCTACTGGCGGATGCCGGCAGGTCGATGCCTATTGGGCGGCCAATATCGA
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
AGGGGCGCGGATGACCGCGCTACGGCGTGCCAGCTACGGATAACCGCGCGTTATAGCT

a S P R L L A R C R H G R C L L G G Q Y R -
b P R A Y W R D A G T V D A Y W A A N I D -
c P A P T G A M P A R S M P I G R P I S T -

SacI
|

CCTCACCGACGTCGTCGCCGAGCTCGACCTGTTGCGACCGCGCCTGGCCGATCTGGTCCTA
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
GGAGTGGCTGCAGCACGGCCTCGAGCTGGACAAGCTGGCGCGGACCGGCTAGACCAGGAT

a P H R R R A G A R P V R F R L A D L V L -
b L T D V V P E L D L F D R A W P I W S Y -
c S P T S C R S S T C S T A P G R S G P M -

TGCGGAGATCACGCCGCTGCCAAGTTCGTCCATGACGAGGAGAGCCGGCGCGGCCAGGC
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
ACGCCCTCTAGTGGCGGACGGTTCAAGCAGTACTGCTCCTCTCGGCCGCGCGGTCCG

a C G D H A A C Q V R P * R G E P A R P G -
b A E I T P P A K F V H D E E S R R G Q A -
c R R S R R L P S S S M T R R A G A A R P -

SacI
|

CGTGAGCTCGCTGGTCTCGGGCGGCTGCATCATCTCCGGCGCCTCGCTGCGCGGCTCGCT
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
GCACTCGAGCGACAGAGCCCGCGACGTAGTAGAGCCGCGGAGCGACGCGCGAGCGA

a R E L A G L G R L H H L R R L A A P L A -
b V S S L V S G G C I I S G A S L R R S L -
c * A R W S R A A A S S P A P R C A A R C -

GCTGTTACCGGCGTGC CGCTCAACTCCTACGCCACTGTCGAGAACGCCGTGATCATGCC
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
CGACAAGTGGCCGACGCGCAGTTGAGGATGCGGTGACAGCTCTTGCGGCACTAGTACGG

a A V H R R A R Q L L R H C R E R R D H A -
b L F T G V R V N S Y A T V E N A V I M P -
c C S P A C A S T P T P L S R T P * S C P -

CTACGTGAACGTCGCTCGCGGCGCTCGCTTGAAGAACGTCGTGATCGACCGCGCGCTCGA
961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
GATGCACTTGACGAGCGCGCGGAGCGAAGTTCTTGCAGCACTAGCTGGCGCGCAGCT

a L R E R R S R R S L E E R R D R P R R R -
b Y V N V A R G A R L K N V V I D R G V E -
c T * T S L A A L A * R T S * S T A A S K -

SacI
|

1021 AATCCCCGAGGGGCTCGTCGTCGGCGAGGACCCGGAGCTCGACGCCAAGCGCTTCCGCAC 1080
TTAGGGGCTCCCCGAGCAGCAGCCGCTCCTGGGCCTCGAGCTGCGGTTCCGGAAGGCGTG

a N P R G A R R R R G P G A R R Q A L P H -
b I P E G L V V G E D P E L D A K R F R T -
c S P R G S S S A R T R S S T P S A S A P -

1081 CACCGAGCAGGGCATCTCGCTCATCACCAGACAATGCTCGACAGGCTCAATACATGACG 1140
GTGGCTCGTCCCGTAGAGCGAGTAGTGGGTCTGTTACGAGCTGTCGAGTTATGTACTGC

a H R A G H L A H H P D N A R Q A Q Y M T -
b T E Q G I S L I T Q T M L D R L N T * R -
c P S R A S R S S S P R Q C S T G S I H D A -

1141 CCTGTTCGGCTCCTCGCGGTCGCGCTCCGAAGTCTACCCGATCGTCAAGACCGGCGGCTC 1200
GGACAAGCGCAGGAGCGCCAGCGGAGGCTTCAGATGGGCTAGCAGTTCTGGCCCGCGGAG

a P V R V L A V A S E V Y P I V K T G G L -
b L F A S S R S P P K S T R S S R P A A S -
c C S R P R G R L R S L P D R Q D R R P R -

1201 GCGGATGTGCGCGGCGCGCTGCGCTTGGCGTGAAGCGGCACGGCGTCGAGATGCGCACG 1260
CGCCTACAGCGGCGCGCGACGGCGAAGCGGACTTCGCGTGCCGAGCTCTACGCGTGC

a A D V A G A L P L A L K A H G V E M R T -
b R M S P A R C R L R * R R T A S R C A R -
c G C R R A A A C A E G A R R R D A H A -

1261 CTGATGCCGGGCTATCCCGACGTGATGCGGATGCTGGGGGAGCCGGCGAAATCCGGCGC 1320
GACTACGGCCGATAGGGCTGCACTACGCTACGACCCCCCTCGGCCGCTTTAGGCCGCG

a L M P G Y P D V M R M L G G A G E I R R -
b * C R A I P T * C G C W G E P A K S G A -
c D A G L S R R D A D A G G S R R N P A L -

1321 TGGCCGGATTATTTCCGGCGGCGGGGCGCCTGCTCGCGGGCTCGCATGACGGCCTCGAC 1380
ACCGGCCTAATAAGCCGCGGGCGGCGGACGAGCGCCGAGCGTACTGCCGAGCTG

a W P D Y F G G P G R L L A G S H D G L D -
b G R I I S A A R A A C S R A R M T A S T -
c A G L E R R P G P P A R G L A * R P R P -

1381 CTGTTCTGCTCGACGTGCGGCATCTTTACGCACGACCGGCAATCCGTACGTCACCCCT 1440
GACAAGCAGAGCTGCACGGCGTAGAAATGCGTGCTGGCCCGTTAGGCATGCAGTGGGGA

a L F V L D V P H L Y A R P G N P Y V T P -
b C S C S T C R I F T H D R A I R T S P L -
c V R A R R A A S L R T T G Q S V R H P * -

1441 GAGGGCGTCGACTGGCCGGAACAACGGTGTGCGCTTCGCGGCACTGTGCGGTATCGCGGCC 1500
CTCCCGCAGTGACCGGCGCTGTTGCCACACGCGAAGCGCCGTGACAGCGCATAGCGCCGG

a E G V D W P D N G V R F A A L S R I A A -
b R A S T G R T T V C A S R H C R V S R P -
c G R R L A G Q R C A L R G T V A Y R G R -

1501 GATATCGGCCACGGCCTCGTGCCCGGCTTCGTGCGGATGTCNNNNNNCATGCCCATGAC 1560
CTATAGCCGGTGCCGGAGCAGGCGGCAAGCACGGCCTACAGNNNNNNGTACGGGTACTG

a D I G H G L V P A F V P D V ? ? H A H D -
b I S A T A S C P R S C R M S ? ? M P M T -
c Y R P R P R A R V R A G C ? ? ? C P * L -

TGGCAGGCGGGGCTCGCGCCGCCCTATCTGCACTATGACGGCGGGCCGCGCCCGGCACC
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 ACCGTCGCGCCCGAGCGCGCCGGATAGACGTGATACTGCCGCGCGCGGGGCGGTGG

 a W Q A G L A P A Y L H Y D G G P R P G T -
 b G R R G S R R P I C T M T A G R A P A P -
 c A G G A R A G L S A L * R R A A P R H R -

 GTGATGACCATCCACAACATGGCCTATCAGGGCAAGTTCGATCGCACGCTGACAAGCGCG
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 CACTACTGGTAGGTGTGTACCGGATAGTCCCGTTCAAGCTAGCGTGCAGCTGTTCCGCGC

 a V M T I H N M A Y Q G K F D R T L T S A -
 b * * P S T T W P I R A S S I A R * Q A R -
 c D D H P Q H G L S G Q V R S H A D K R D -

 ATCGGCCTGCCCGCGCGCGCGGCTTCGACGTTACGGCCTCGAATATTTCCGCGGCATC
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 TAGCCGACGGCGCGCGCGCGCAAGCTGCAAGTGCCGGAGCTTATAAAGCCGCGCTAG

 a I G L P A A A A F D V H G L E Y F G G I -
 b S A C P R R R R S T F T A S N I S A A S -
 c R P A R G G G V R R S R P R I F R R H Q -

 AGCTTCCTCAAGCGGGGCTTCAACTCGCCGATCGCATCACCACGGTATCGCCGACCTAT
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 TCGAAGGAGTTCCGCCCCAAGTTGAGCGGCTAGCGTAGTGGTGCATAGCGGCTGGATA

 a S F L K A G L Q L A D R I T T V S P T Y -
 b A S S R R G F N S P I A S P R Y R R P M -
 c L P Q G G A S T R R S H H H G I A D L C -

 GCGCAGGAGATCCAGAGCGATGAAGGCGGCATGGGGCTCGGCGGCCTGCTGCGCGAACGC
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 CGCGTCCTCTAGGTCTCGCTACTTCCGCGTACCCGAGCCGCGGACGACGCGCTTGGC

 a A Q E I Q S D E G G M G L G L L R E R -
 b R R R S R A M K A A W G S A A C C A N A -
 c A G D P E R * R R H G A R R P A A R T R -

 GCCGATGTGCTGAGCGGCATCTCAACGGCATCGACACGACGTGTGAATCCGCAAACC
 1861 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 CGGCTACACGACTCGCCGTAGGAGTTGCCGTAGCTGTGGCTGCACACCTTAGGCGTTGG

 a A D V L S G I L N G I D T D V W N P Q T -
 b P M C * A A S S T A S T P T C G I R K P -
 c R C A E R H P Q R H R H R R V E S A N R -

 GATCCGCACATCGCCTACCGCTTCGGCGCGGAGGATCTCACGTTCCGCGCGCGAACAAG
 1921 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
 CTAGGCGTGTAGCGGATGGCGAAGCCGCGCCTCCTAGAGTGCAAGGCGCGGCGCTTGTTC

 a D P H I A Y R F G A E D L T F R A A N K -
 b I R T S P T A S A R R I S R S A P R T R -
 c S A H R L P L R R G G S H V P R R E Q G -

 GCGGTGCTTCAGCAACAGTTCACTCTCGATTCTCGGACGAGGCACCGTTGCTCGGCGTC
 1981 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
 CGCCACGAAGTCGTTGTCAAGTCAGAGCTAAGGAGCCTGCTCCGTGGCAACGAGCCGCAG

 a A V L Q Q Q F S L D S S D E A P L L G V -
 b R C F S N S S V S I P R T R H R C S A S -
 c G A S A T V Q S R F L G R G T V A R R H -

 ATCAGCCGCTGTCTGGCAGAAAGGGCTCGATCTCCTGCTCGAGGCCATTCCGACCATT
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 TAGTCCGCGGACAGGACCGTCTTTCCCGAGCTAGAGGACGAGCTCCGGTAAGGCTGGTAA

 a I S R L S W Q K G L D L L L E A I P T I -
 b S A A C P G R K G S I S C S R P F R P F -
 c Q P P V L A E R A R S P A R G H S D H F -

TTGGGCGACGGCATGCAGCTCGCGCTGCTCGGCAGCGGCGATCGCGATCTCCAGGATCGC
 2101 -----+-----+-----+-----+ 2160
 AACCCGCTGCCGTACGTCGAGCGGACGAGCCGTCGCCGCTAGCGCTAGAGGTCCTAGCG

a L G D G M Q L A L L G S G D R D L Q D R -
 b W A T A C S S R C S A A A I A I S R I A -
 c G R R H A A R A A R Q R R S R S P G S L -

TATCAGGCCGTCGCCCGCGGAACCCGGGCGGATCGGCGTCGTATCGGCTATGACGAG
 2161 -----+-----+-----+-----+ 2220
 ATAGTCCGGCAGCGGGCGCGCTTGGGGCCCGCTAGCCGACGACTAGCCGATACTGCTC

a Y Q A V A R A N P G R I G V V I G Y D E -
 b I R P S P A R T P G G S A S * S A M T R -
 c S G R R P R E P R A D R R R D R L * R D -

ATTCTGGCGACCTGATCCAGGCCGATCGGACGCGCTCATCGTACCCTCGCGGTTTCGAG
 2221 -----+-----+-----+-----+ 2280
 TAAGACCGCGTGGACTAGGTCCGGCCTAGCCTGCGCGAGTAGCATGGGAGCGCCAAGCTC

a I L A H L I Q A G S D A L I V P S R F E -
 b F W R T * S R P D R T R S S Y P R G S S -
 c S G A P D P G R I G R A H R T L A V R A -

CCGTGGCGGCTGACCCAACCTCTACGCGCTGCGCTACGGCGCTGTCCCGATCGTGTCGCGC
 2281 -----+-----+-----+-----+ 2340
 GGCACGCGGACTGGGTTGAGATGCGCGACGCGATGCCGCGACAGGGCTAGCACAGCGCG

a P C G L T Q L Y A L R Y G A V P I V S R -
 b R A A * P N S T R C A T A L S R S C R A -
 c V R P D P T L R A A L R R C P D R V A R -

GTCGGCGGCTCTGAAGACACCATCGTCGATATCGGCGAGGCCaACACATCGGACCGCGAC
 2341 -----+-----+-----+-----+ 2400
 CAGCCGCGGAGcTTCTGTGGTAGCAGCTATAGCCGCTCCGGtTGTGTAGCCTGGCGCTG

a V G G L E D T I V D I G E A N T S D R D -
 b S A A S K T P S S I S A R P T H R T A T -
 c R R P R R H H R R Y R R G Q H I G P R P -

CCGACCGGCTTCAAGTTCGCGCCCGTCACCGTGGAGGCCCTCACCGGCACGCTGCGCAAG
 2401 -----+-----+-----+-----+ 2460
 GGCTGGCCGAAGTTCAGCGCGGGCAGTGGCACCTCCGGGAGTGGCCGTGCGACGCGTTC

a P T G F K F A P V T V E A L T G T L R K -
 b R P A S S S R P S P W R P S P A R C A R -
 c D R L Q V R A R H R G G P H R H A A Q G -

GCCAACACCGCCTTCCACAACAAGCGACCTGGCGCCGGCTGCAATTGAGCGGCCTTGGC
 2461 -----+-----+-----+-----+ 2520
 CGGTTGTGGCGGAAGGTGTGTTCCGCTGGACCGCGCGCGACGTTAACTCGCCGGAACGC

a A N T A F H N K A T W R R L Q L S G L A -
 b P T P P S T T R R P G A G C N * A A L R -
 c Q H R L P Q Q G D L A P A A I E R P C D -

ACCGACGTCTCTGGCGCAACCGCGCGCGGCGACTATGCCGTGCTCTATCGCGATCTCATG
 2521 -----+-----+-----+-----+ 2580
 TGGCTGCAGAGGACCGCGTTGGCGCGGCGCTGATACGGCACGAGATAGCGCTAGAGTAC

a T D V S W R N R A G D Y A V L Y R D L M -
 b P T S P G A T A P A T M P C S I A I S W -
 c R R L L A Q P R R R L C R A L S R S H G -

GCGGCGCGCCGACCTGAGGCGGCGAGGCTGCCGCATGTGAATAGCGGCTTCCCTGCGGC
 2581 -----+-----+-----+-----+ 2640
 CGCCGCGCGGCTGGACTCCGCCGTCCCGACGGCGTACACTTATCGCCGAAGGGACGCGC

a A A R R T * G G R A A A C E * R L P C G -
 b R R A A P E A A G L P H V N S G F P A A -
 c G A P H L R R Q G C R M * I A A S L R P -

CATCTTTTCGAGACGCCCGCTTCGCGGGCTCCTCAGGATGAGGGCGGAGTATGCGGCAGC
 2641 -----+-----+-----+-----+ 2700
 GTAGAAAGCTCTGCGGGCGCAAGCGCCGAGGAGTCTACTCCGCTCATACGCGCTCG

 a H L S R R P R S R A P Q D E G G V C G S -
 b I F R D A R V R G L L R M R A E Y A A A -
 c S F E T P A F A G S S G * G R S M R Q Q -

 AATTTCGACGGCACCGATGCTGCTTAGCCTCATCCTGAGGAGACCGCAGAGCGGTGCTCT
 2701 -----+-----+-----+-----+ 2760
 TTAAAGCTGCGGTGGCTACGACGAATCGGAGTAGGACTCCTCTGGCGTCTCGCCAGCAGA

 a N F D G T D A A * P H P E E T A E R S S -
 b I S T A P M L L S L I L R R P Q S G R L -
 c F R R H R C C L A S S * G D R R A V V S -

 CGAAGGACGAGGCGCGCGGCGCGCGCGCGCGCGCAAGAAGCCCGCGCCAAAAACACGGTCACC
 2761 -----+-----+-----+-----+ 2820
 GCTTCTGCTCCGCGCGCGCCTCGGCGCGGTTCTTCGGGCGCGGTTTTTGCCAGTGG

 a R R T R R A R S R R Q E A R A K N T V T -
 b E G R G A R G A A A K K P A P K T R S P -
 c K D E A R A E P P P R S P R Q K H G H H -

 ACCGAATCCATGCTATAGAGCCGGCATGGACCCTTTTCGCGATCAAGCTGATCGGCTTTGC
 2821 -----+-----+-----+-----+ 2880
 TGGCTTAGGTACGATATCTCGGCGGTACCTGGGAAAGCGCTAGTTGACTAGCCGAAACG

 a T E S M L * S R H G P F R D Q A D R L C -
 b P N P C Y R A G M D P F A I K L I G F A -
 c R I H A I E P A W T L S R S S * S A L P -

 CGCCGCAACCTGCACCACCGTCGCGTACGCGCGCAGTTTCATCAAGGTCTGGAAGACCCG
 2881 -----+-----+-----+-----+ 2940
 GCGGCGTTGGACGTGGTGGCAGCGCATGCGCGGCGTCAAGTAGTTCCAGACCTTCTGGGG

 a R R N L H H R R V R A A V H Q G L E D P -
 b A A T C T T V A Y A P Q F I K V W K T R -
 c P Q P A P P S R T R R S S S R S G R P A -

 CTCGGCGCGCGACATTTTCGCTCGGCATGTTCTGCTCATGGTGCTGGGCTGGCGCTCTG
 2941 -----+-----+-----+-----+ 3000
 GAGCCGCGCGCTGTAAAGCGAGCCGTACAAGGACCACTACCACGACCCGGACCGCGAGAC

 a L G A R H F A R H V P G H G A G P G A L -
 b S A R D I S L G M F L V M V L G L A L W -
 c R R A T F R S A C S W S W C W A W R S G -

 GCTCATCTACGGCTGCTCTCTGGCGACGCCCCGCTGGTCGCGGCCAACGCCATCACCAT
 3001 -----+-----+-----+-----+ 3060
 CGAGTAGATGCCGACGAGAGACCGCTGCGGGGCGACCAGCGCGGTTGCGGTAGTGGTA

 a A H L R P A L W R R P A G R G Q R H H H -
 b L I Y G L L S G D A P L V A A N A I T M -
 c S S T A C S L A T P R W S R P T P S P W -

 GGTGCTCGCGGGCGGTATCCTGTTTCATGAAGCTGAAGTATGGGTGAGGTTGAAGCTGCGT
 3061 -----+-----+-----+-----+ 3120
 CCACGAGCGGCGCCATAGGACAAGTACTTCGACTTCATACCCACTCCAACCTTCGACGCA

 a G A R R R Y P V H E A E V W V R L K L R -
 b V L A G G I L F M K L K Y G * G * S C V -
 c C S P A V S C S * S * S M G E V E A A * -

 AGGACGGATTGGCGCGTGTACCCATAAAATCCGGGATGCTGTTTTTCGAGGGGCCCCGGA
 3121 -----+-----+-----+-----+ 3180
 TCCTGCCTAACCGCGCACATGGGTATTTTAGGCCCTACAGACAAAAGCTCCCCGGGCGCT

 a R T D W R V Y P * N P G C L F S R G P G -
 b G R I G A C T H K I R D V C F R G A P E -
 c D G L A R V P I K S G M S V F E G P R S -

GCGGACATAGACAATCGATCATCGTGTGGTCCGTGCGGTACCTGAAAGGTAACGGTCCTT
 3181 -----+-----+-----+-----+-----+ 3240
 CGCCTGTATCTGTTAGCTAGTAGCACACCAGGCACGCCATGGACTTTCATTGCCAGGAA

 a A D I D N R S S C G P C G T * K V T V L -
 b R T * T I D H R V V R A V P E R * R S L -
 c G H R Q S I I V W S V R Y L K G N G P * -

 GATCCAGATCAAGTCAGACTGTTTGTAGCCCGCTGCTTAATTGCCAATATGCCAGGCCGC
 3241 -----+-----+-----+-----+-----+ 3300
 CTAGTCTAGTTCAGTCTGACAAACATCGGGCGACGAATTAACGGTTATACGGTCCGGCG

 a D P D Q V R L F V A R C L I A N M P G R -
 b I Q I K S D C L * P A A * L P I C Q A A -
 c S R S S Q T V C S P L L N C Q Y A R P R -

 GGGAGCCGCCTCCGTAGCGCGCGGAAACATTCTTCGTCGCTACGACGCCCGCGCAATA
 3301 -----+-----+-----+-----+-----+ 3360
 CCCTCGGCGGAGGCATCGCCCGCGCCTTTGTAAGAAGCAGCGATGCTGCGCGCGCGTTAT

 a G S R L R S G A G N I L R R Y D A A A I -
 b G A A S V A A P E T F F V A T T P P Q Y -
 c E P P P * R R R K H S S S L R R R R N M -

 TGAAGGGGCGGCGACAGACGCATTCTCAACACCGATCTCGCGTTCCCAAGGGGCGCCTA
 3361 -----+-----+-----+-----+-----+ 3420
 ACTTCCCCGCGCTGTCTGCGTAAGAGTTGTGGCTAGAGCGCAAGGGTTCCCCCGCGGAT

 a * R G G D R R I L N T D L A F P R G R L -
 b E G A A T D A F S T P I S R S Q G G A Y -
 c K G R R Q T H S Q H R S R V P K G A P M -

 TGAGTAGATCAGAAGTTGACGTCCAAGATCTGCGAATGATGGAAAGGTGCCCTCGAACTCG
 3421 -----+-----+-----+-----+-----+ 3480
 ACTCATCTAGTCTTCAACTGCAGGTTCTAGACGCTTACTACCTTTCCACGGAGCTTGAGC

 a * V D Q K L T S K I C E * W K G A S N S -
 b E * I R S * R P R S A N D G K V P R T R -
 c S R S E V D V Q D L R M M E R C L E L A -

 CCCGCAAGGGGTGAAGGAAGGAGAGCTGCCATTGCGCGCCGTAATCGCGTTTCGAGGAC
 3481 -----+-----+-----+-----+-----+ 3540
 GGGCGGTTCCCCACTTCTCTCTCGACGGTAAGCCGCGGCATTAGCGCAAAGCTCCTG

 a P G K G * R K E S C H S A P * S R F E D -
 b P A R G E G R R A A I R R R N R V S R T -
 c R Q G V K E G E L P F G A V I A F R G Q -

 AGGTCATCGCAGAAGCGACCAACCACGTTTCATCGGAATGCGACGTGACCCGACACGCGG
 3541 -----+-----+-----+-----+-----+ 3600
 TCCAGTAGCGTCTTCGCTGGTTGGTGCAAAGTAGCCTTACGCTGCACTGGGCTGTGCGCC

 a R S S Q K R P T T F H R N A T * P D T R -
 b G H R R S D Q P R F I G M R R D P T R G -
 c V I A E A T N H V S S E C D V T R H A E -

 AACTCGTGGCTCTTTCAGAGGCGCAGAAGATTCTAAGACAAAAGCGTTTGCCGGATTGCA
 3601 -----+-----+-----+-----+-----+ 3660
 TTGAGCACCGAGAAAGTCTCCGCGTCTTCTAAGATTCTGTTTTCGCAAACGGCCTAACGT

 a N S W L F Q R R R R F * D K S V C R I A -
 b T R G S F R G A E D S K T K A F A G L H -
 c L V A L S E A Q K I L R Q K R L P D C T -

 CCTTGATTCAATCGTCGAACCTTGCCCAATGTGTTCTTTCCGGCACGGGAGGCGCGGA
 3661 -----+-----+-----+-----+-----+ 3720
 GGAACATAAGTTAGCAGCTTGAACGGTTACACAAGAAAGGCGCGTCCCTCCGCGCCT

 a P C I Q S S N L A Q C V L S R H G R R G -
 b L V F N R R T L P N V F F P G T G G A D -
 c L Y S I V E P C P M C S F P A R E A R I -

```

      TTGGTCGCGTGGTGTTCGCCATTTTCATCTCCGATCATGGGCGGATTTCGAGATGGGACG
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
      AACCAGCGCACCACAAGCGGTAAAGTAGAGGCTAGTACCGCCTAAAAGCTCTACCGCTGC

a     L V A W C S P F H L R S W A D F R D G T -
b     W S R G V R H F I S D H G R I F E M G R -
c     G R V V F A I S S P I M G G F S R W D V -

      TTCTGTCGGACAACAGTTTGTTCGAGCAAACCTGCCTGAGGTCTTCGGACCTGCGCCGAAA
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
      AAGACAGCCTGTTGTCAAACAGCTCGTTTGACGGACTCCAGAAGCCTGGACGCGGCCTTT

a     F C R T T V C R A N C L R S S D L R R K -
b     S V G Q Q F V E Q T A * G L R T C A G N -
c     L S D N S L S S K L P E V F G P A P E I -

      TCGTCTCGGGCTTGCTATCCCAAAGGGCCGAGCAGGTTTGGCGGACTGGAACCCGCTCG
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
      AGCAGAGCCCGAACGATAGGGTTTCCCGGCTCGTCCAAACCGCGCTGACCTTGGGCGAGC

a     S S R A C Y P K G P S R F G A T G T R S -
b     R L G L A I P K G R A G L A R L E P A R -
c     V S G L L S Q R A E Q V W R D W N P L A -

      CCTGGCGATTATGAGACGACGAGGCTGCTTCGGACGAGCGGCCGAGCAGACTTCGTGCC
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
      GGACCGCTAAATACTCTGCTGCTCCGACGAAGCCTGCTCGCCGGCTCGTCTGAAGCACGG

a     P G D L * D D E A A S D E R P S R L R A -
b     L A I Y E T T R L L R T S G R A D F V P -
c     W R F M R R R G C F G R A A E Q T S C H -

      ACGCGGGCGCGCCTCGGCCAACGTTTTCTGGAACGCGCTGGCGGATATTTTGGCCGCGC
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
      TGGCGCCGCGCGGAGCGGTTGCAAAAGGACCTTGGCGGACCGCCTATAAAACCGGCGCG

a     T R A R L G Q R F P G T R W R I F W P R -
b     R G R A S A N V F L E R A G G Y F G R A -
c     A G A P R P T F S W N A L A D I L A A P -

      CGGCTCTTTTCGGTGAGTAACGTCTTCTGCGCGCGGCTGCAGATTCAAACACCATCTCGG
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
      GCCGAGAAAGCCACTCATTGCAGAAGGACGCGCGCCGACGCTAAGTTTGTGGTAGAGCC

a     R L F R * V T S S C A G V Q I Q T P S R -
b     G S F G E * R L P A P A C R F K H H L G -
c     A L S V S N V F L R R R A D S N T I S D -

      ACCTGCACAAGCCTGGAGTCTGAGATCGGGAGCGCGCTGCTGCAGGATCAGGCGCGTGTG
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
      TGGACCTGTTTCGGACCTCAGACTCTAGCCCTCGCGGACGACGCTCTAGTCCGCGCACAC

a     T W T S L E S E I G S A L L Q D Q A R V -
b     P G Q A W S L R S G A R C C R I R R V W -
c     L D K P G V * D R E R A A A G S G A C G -

      GCTATCGTTTCAAGTGCACGCGTCCGAATGGGACGCGGTCTCGTGAACACAGGTGCGGG
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
      CGATAGCAAAGTTCAGTGCAGCAGCCTTACCCCTGCGCCAGAGCACTTGTGTCCAGGCC

a     A I V S S A R V G M G T R S R E H R C G -
b     L S F Q V H A S E W G R G L V N T G A G -
c     Y R F K C T R R N G D A V S * T Q V R E -

      SacI
      |
      AAACCAAGTGAGCTCCGAGCCGTCGCTTGGCGCTGCGCAAAGCCATCACCGCCATGACG
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
      TTTGGTTTCACTCGAGGCTCGGCAGCGAACCAGCGCGCTTTTCGGTAGTGGCGGTACTGC

a     K P K * A P S R R L A L R K A I T A M T -
b     N Q S E L R A V A W R C A K P S P P * R -
c     T K V S S E P S L G A A Q S H H R H D G -

```

```

GAGTCAATGGCGAGCCGGCCAAAGACCAGGGAGTTGCCCGGGTCTTGAACAAGCGAACGT
4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
CTCAGTTACCGCTCGGCCGGTTCTGGTCCCTCAACGGGGCCAGAACTTGTTGCGTTGCA

a   E S M A S R P R P G S C P G S * T S E R -
b   S Q W R A G Q D Q G V A P G L E Q A N V -
c   V N G E P A K T R E L P R V L N K R T S -

CCAATCTTGCGCAGTTCAGGCTTACCTGCTGGCCCGATATCTATGAGCGCTGCCCTCGGA
4321 -----+-----+-----+-----+-----+ 4380
GGTTAGAACGCGTCAAGTCCGAATGGACGACCGGGCTATAGATACTCGCGACGGGAGCCT

a   P I L R S S G L P A G P I S M S A A L G -
b   Q S C A V Q A Y L L A R Y L * A L P S E -
c   N L A Q F R L T C W P D I Y E R C P R K -

                                EcoRI
                                |
AGTTTTCGATGAGCGGGGTTTAGAACAACACGACAGCGCAAAGGGAATTCGATATCAA
4381 -----+-----+-----+-----+-----+ 4440
TCAAAGCTACTCGCCCCAAATCTTGTGTGTGTCTGCCGTTCCCTTAAGCTATAGTT

a   S E R * A G F R T T R Q T A K G I R Y Q -
b   V F D E R G L E Q H D R R Q R E F D I K -
c   F S M S G V * N N T T D G K G N S I S S -

GCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGNCNCCGGTACCCAGCAT
4441 -----+-----+-----+-----+ 4487
CGAATAGCTATGGCAGCTGGAGCTCCCCCGNGGCCATGGGTCGTA

a   A Y R Y R R P R G G A P V P S -
b   L I D T V D L E G G ? R Y P A -
c   L S I P S T S R G G ? G T Q H -

```

La secuencia de *B. loti* está delimitada por los sitios de restricción *Eco* RI. Los asteriscos (*) indican los codones "stop" y las secuencias subrayadas indican los codones "start" de cada gen. Los residuos aminoacídicos marcados con rojo muestran la secuencia deducida que corresponde a la ADPGlc PPasa. Los aminoácidos marcados con azul muestran la secuencia primaria de la glucógeno sintasa. Los aminoácidos marcados con verde muestran la secuencia deducida de la proteína homóloga a PBRs 6460 de *B. japonicum*. La secuencia marcada con violeta codifica para una proteína homóloga a BLR 7496 de *B. japonicum*, que está relacionada con la fijación de nitrógeno.

R. 2. - IDENTIFICACIÓN DE LOS REGULADORES ALOSTÉRICOS DE LA ADPGlc PPASA DE *B. LOTI*. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RELATIVO DE LA ENZIMA BACTERIANA Y VEGETAL EN NÓDULOS

La ADPGlc PPasa de *B. loti* se purificó 17 veces con un 41% de rendimiento, tal como se describe en la sección MM. 5. 3. Luego de dos etapas de purificación, la enzima parcialmente purificada, se utilizó para medir la actividad en el sentido de la pirofosforólisis, en presencia de distintos metabolitos e identificar los efectores alostéricos que la regulan. Se probaron diferentes metabolitos que son activadores conocidos en distintas ADPGlc PPasas. Además, se realizó una medición paralela de la actividad enzimática en el sentido de la pirofosforólisis, con la enzima purificada de *A. tumefaciens* que ya había sido caracterizada, para comparar los activadores alostéricos que regulan ambas enzimas. Se calculó el cociente entre la actividad específica en presencia y en ausencia de efector. Los resultados de dichos cocientes demuestran que la ADPGlc PPasa de *B. loti* es activada por Fru 6P, piruvato y Fru 1,6 bisP e inhibida por Pi, AMP y ADP (Tabla 2. 2). En este sentido, se observa que los efectores de la enzima de *B. loti* son similares a los caracterizados para la ADPGlc Pasa de *A. tumefaciens* (Uttaro et al., 1998).

Tabla 2. 2.- Efecto de diferentes metabolitos sobre la activación de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* y de *B. loti*

metabolito	<i>A. tumefaciens</i>		<i>B. loti</i>	
	AE(U/mg)	v. activ.	AE(U/mg)	v. activ.
Ninguno	4.05	1.00	0.0048	1.00
Fru 6 P	23.54	5.80	0.011	2.29
Fru 1,6 bisP	4.11	1.00	0.0095	1.98
Piruvato	18.40	4.54	0.0095	1.98
3PGA	1.82	0.45	0.0035	0.72
ADP	2.50	0.62	0.0021	0.45
Pi	0.76	0.18	0.0004	0.08
AMP	0.49	0.12	0.003	0.63

AE: actividad específica expresada como U/mg. V.activ: veces de activación, calculada como el cociente entre la AE con efector /AE sin efector. Los metabolitos resaltados en azul son los activadores y los metabolitos resaltados en rojo son los inhibidores de la ADPGlc Pasa de *B. loti*.

Como se mencionó en la sección 2.2.2.2.1.de la Introducción General, se sabe que existe una relación entre los activadores de las ADPGlc PPasas y la principal vía de utilización de la fuente de carbono que posee el organismo del cual proviene dicha enzima. En este sentido, los reguladores alostéricos que activan las ADPGlc PPasas de origen vegetal son diferentes a los presentes en las ADPGlc PPasas bacterianas. En plantas, el activador es 3PGA, el producto primario de la fijación a partir de la fotosíntesis, mientras que para la enzima de origen bacteriano, los activadores más frecuentemente encontrados son Fru 6P, Fru 1,6 bisP y piruvato.

Los resultados anteriores (Tabla 2. 2) demostraron que estos tres metabolitos activan la ADPGlc PPasa de *B. loti*.

Dado que en el nódulo hay proteínas de origen vegetal y bacteriano, para identificar las distintas actividades de las ADPGlc PPasas de diferente origen biológico, nos basamos en los diferentes efectores que regulan positivamente a cada una, como herramienta para distinguirlas. De esta manera, pudimos dosar las actividades específicas de cada una de ellas a partir de extractos crudos de nódulos (sección MM. 5. 1). Luego determinamos el porcentaje de AE de ADPGlc PPasa bacteriana en el nódulo, respecto de la actividad de la ADPGlc PPasa presente en las células vegetales, de la siguiente manera:

$$\% \text{ AE ADPGlc PPasa bacteriana} = (\text{AE bacteriana} / \text{AE vegetal}) \times 100$$

Los resultados presentados en la Tabla 2. 3 indican que la actividad de ADPGlc PPasa de origen bacteriano se incrementa con la edad de los nódulos, mientras la actividad de nitrogenasa se mantiene constante.

Tabla 2. 3.-- Contenido relativo de actividad de ADPGlc PPasa bacteriana y vegetal en nódulos de distintos estadios post inoculación.

Tiempo post-inoculación (días)	% de AE de ADPGlc PPasa bacteriana (AE bact/AE veg) x 100	Actividad de nitrogenasa umoles etileno/h.p.f nódulo(g)
16	0 – 6,4	7,6 - 13,52
27	3,6 – 18	3,11 - 12,00
38	81,25 – 100	5,4 - 14,08

La AE se determinó tal como se describe en MM. 5. 1. La AE está expresada como Unidades/ mg de proteínas (U/mg). Los datos presentados en la tabla corresponden a los valores máximos y mínimos de % de AE de ADPGlc PPasa bacteriana y de actividad de nitrogenasa en nódulos, obtenidos de ensayos independientes.

R. 3.- Estudio del rol que desempeñan los residuos de arginina localizados en la región regulatoria altamente conservada de las ADPGlc PPasas reguladas por Fru-6P y piruvato, utilizando como modelo experimental la enzima de *A. tumefaciens*

A partir de las similitudes encontradas respecto a las propiedades regulatorias entre las ADPGlc Pasas de *B. loti* y de *A. tumefaciens* y del hecho de disponer en nuestro laboratorio del clon molecular para la expresión de la enzima de la última fuente, nos propusimos ahondar sobre los estudios de relación de estructura a función de esta proteína. Así, procedimos a reemplazar las argininas de las posiciones 32, 33 y 45 en la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens*, por otros residuos aminoacídicos (Figura 2. 9), mediante mutagénesis sitio dirigida, para analizar el efecto que tiene un cambio de carga, tamaño o hidrofobicidad en estas posiciones. Esta elección estuvo dada por estudios previos (Gomez Casati et al., 2001) que mostraban que esta región N-terminal cumple una función relevante en la regulación alostérica de la enzima, así como en determinar la especificidad relativa por los efectores Fru-6P y piruvato. de esta forma, quisimos analizar la función de distribución de cargas, voluminosidad de grupos e hidrofobicidad en esta región de la ADPGlc Pasa de *A. tumefaciens*.

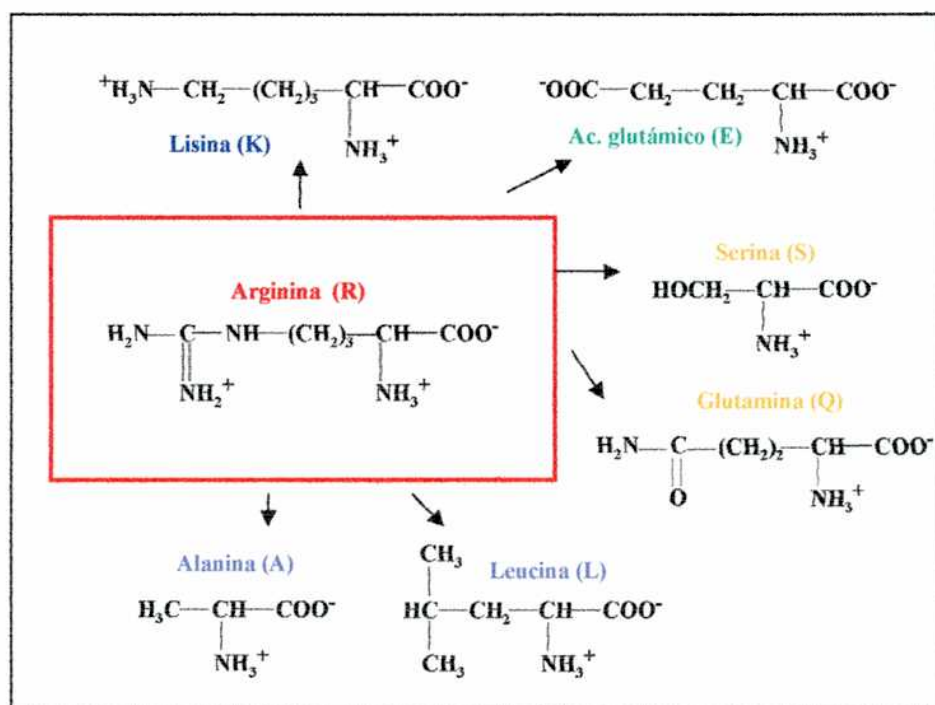


Figura 2. 9.- Aminoácidos que se reemplazaron mediante mutagénesis sitio-dirigida en posiciones R32, 33 y 45

R. 3. 1.- Efecto de las sustituciones aminoacídicas sobre los parámetros cinéticos de la ADPGlc PPasa para los sustratos ATP y Glc 1P

Sustituciones en la posición 32

Los parámetros cinéticos de las distintas mutantes en la posición 32 para el sustrato ATP se muestran en la Tabla 2. 4. En ausencia de activadores, los valores de $S_{0.5}$ para ATP y la V_{max} no varían significativamente, respecto a los valores de la enzima tipo salvaje. Las enzimas R32L, R32Q, R32S y R32E tienen valores de V_{max} menores que la enzima tipo salvaje, mientras que la V_{max} para la enzima R32K fue similar a la enzima R32A (Gomez Casati et al., 2001) y a la enzima tipo salvaje.

En presencia de Fru 6P 2 mM, todas las mutantes presentaron valores de $S_{0.5}$ para ATP mayores que para la enzima tipo salvaje, tal como se describió para la R32A (Gomez Casati et al., 2001).

Por otra parte, en presencia de Fru 6P, todas las enzimas alteradas excepto R32A, R32L y R32K mostraron V_{max} menores que para la enzima tipo salvaje. Este efecto se revirtió con una sustitución por un grupo neutro (R32A), un grupo hidrofóbico (R32L) o por un aminoácido con carga neta positiva (R32K) (Tabla 2. 4).

En presencia de piruvato 2 mM, todas las enzimas mutadas mostraron valores de $S_{0.5}$ para ATP mayores que para la enzima tipo salvaje. La sustitución por una carga negativa (R32E) disminuyó la V_{max} de la enzima, 5 veces, así como la sustitución por leucina (R32L) donde los valores de la V_{max} disminuyeron 2,5 veces respecto a la enzima salvaje. Estas sustituciones tuvieron efectos diferentes a los observados anteriormente con la enzima R32A (Gomez Casati et al., 2001) cuya V_{max} no se modificó en presencia de piruvato 2 mM (Tabla 2. 4).

El efecto de las diferentes mutaciones sobre la cinética de los sustratos Glc1P y Mg++ en presencia y ausencia de los activadores Fru 6P y piruvato también fue estudiado. Todas las enzimas mutadas presentaron un comportamiento similar a la enzima tipo salvaje (datos no mostrados).

Sustituciones en las posiciones 33 y 45

En la Tabla 2. 4 se muestran los parámetros cinéticos de las ADPGlc PPasas modificadas respecto de los aminoácidos de las posiciones 33 y 45 para ATP, en ausencia y presencia de los activadores Fru 6P y piruvato. En ausencia de efectores, los valores de $S_{0.5}$ para ATP fueron entre 2 y 3 veces mayores para las enzimas alteradas R33E, R45K, R33K y R45Q y 6,5 veces mayor que la enzima salvaje para la enzima R33Q mientras que R33S tuvo un $S_{0.5}$ 10 veces menor que la proteína salvaje. La enzima R45L fue la única que tuvo la misma afinidad que la enzima salvaje por el ATP. Los valores de V_{max} para las mutantes R33 estuvieron entre 0,9 y 66,4 U/mg y entre 1,9 y 17 U/mg para las mutantes R45 (Tabla 2. 5).

En presencia de Fru 6P, los valores de $S_{0.5}$ para las enzimas R33 y R45 fueron mayores que para la enzima salvaje, excepto para R33S cuya afinidad fue similar a la enzima de *A. tumefaciens*. Por otra parte, los valores de V_{max} para todas las mutantes R33 y R45 fueron menores que para la enzima salvaje (Tabla 2. 5).

En presencia de piruvato, la afinidad por el ATP no se modificó significativamente, excepto para R33Q que tuvo una afinidad 14 veces menor respecto a la enzima salvaje. Los valores de V_{max} con piruvato para todas las mutantes R33 y R45 fueron menores que para la enzima salvaje (Tabla 2. 4). Tal

como se observó para las mutantes R32, los parámetros cinéticos para la Glc1P y Mg^{++} fueron similares a la enzima salvaje (datos no mostrados).

Tabla 2. 4.- Parámetros cinéticos para el sustrato ATP, de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* con distintas mutaciones en la posición 32

enzima	ATP			ATP + 2 mM Fru 6 P			ATP + 2 mM piruvato		
	S0.5 (mM)	n Hill	V _{max} (U/mg)	S0.5 (mM)	n Hill	V _{max} (U/mg)	S0.5 (mM)	n Hill	V _{max} (U/mg)
wt	0,21 ± 0,04	1,3 ± 0,2	12,1 ± 1,00	0,05 ± 0,00	1,3 ± 0,1	147 ± 4,30	0,10 ± 0,01	1,9 ± 0,3	105 ± 5,00
R32A	0,21 ± 0,02	2,1 ± 0,3	11,6 ± 0,30	0,25 ± 0,02	2,0 ± 0,2	125 ± 3,90 c	0,39 ± 0,03	1,7 ± 0,2	98,6 ± 2,60
R32L	0,11 ± 0,03	1,6 ± 0,5	5,20 ± 0,40	0,32 ± 0,06	2,8 ± 0,6	60,2 ± 3,00 c	0,27 ± 0,04	2,1 ± 0,5	41,0 ± 2,10 a
R32E	0,13 ± 0,01	2,3 ± 0,5	4,10 ± 0,10	0,17 ± 0,03	2,4 ± 0,8	4,10 ± 0,30	0,46 ± 0,10	0,9 ± 0,1	20,0 ± 2,00 b
R32K	0,70 ± 0,06	1,0 ± 0,3	13,0 ± 2,40	0,09 ± 0,01	1,3 ± 0,2	75,5 ± 3,20	0,25 ± 0,02	2,8 ± 0,6	38,2 ± 1,50
R32Q	0,14 ± 0,03	1,2 ± 0,5	5,10 ± 1,10	0,16 ± 0,01	1,9 ± 0,2	5,20 ± 1,20	0,16 ± 0,02	2,7 ± 0,5	35,3 ± 6,20
R32S	0,52 ± 0,01	1,4 ± 0,3	5,40 ± 0,51	0,42 ± 0,05	3,6 ± 1,1	15,2 ± 2,40	0,29 ± 0,05	1,2 ± 0,2	30,8 ± 5,45

Wt, enzima tipo salvaje; **a**, V_{max} con 10 mM piruvato; **b**, V_{max} con 20 mM piruvato; **c**, V_{max} con 10 mM Fru 6P

Tabla 2. 5.- Parámetros cinéticos para el sustrato ATP, de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* con mutaciones en las posiciones 33 y 45

enzima	ATP			ATP + 2 mM Fru 6P			ATP + 2 mM piruvato		
	S0.5 (mM)	n Hill	Vmax (U/mg)	S0.5 (mM)	n Hill	Vmax (U/mg)	S0.5 (mM)	n Hill	Vmax (U/mg)
wt	0,21 ± 0,04	1,3 ± 0,2	12,1 ± 1,00	0,05 ± 0,00	1,3 ± 0,1	147 ± 4,00	0,10 ± 0,01	1,9 ± 0,3	105 ± 5,00
R33A	0,44 ± 0,07	1,2 ± 0,2	66,4 ± 3,00	0,43 ± 1,30	1,3 ± 0,3	60,8 ± 3,10	0,06 ± 0,01	2,4 ± 0,7	96,0 ± 4,00
R33E	0,38 ± 0,03	2,1 ± 0,3	47,0 ± 2,10	0,42 ± 0,06	1,6 ± 0,4	48,0 ± 4,00	0,08 ± 0,01	1,4 ± 0,3	46,0 ± 3,00
R33Q	1,36 ± 0,08	6,6 ± 0,9	5,10 ± 1,30	0,97 ± 0,04	3,5 ± 0,8	4,80 ± 1,00	1,37 ± 0,82	1,4 ± 0,4	8,20 ± 0,70
R33K	0,61 ± 0,17	4,2 ± 1,2	0,90 ± 0,10	1,20 ± 0,20	1,0 ± 0,3	1,50 ± 0,30	0,35 ± 0,08	1,5 ± 0,5	4,90 ± 1,00
R33S	0,02 ± 0,00	1,5 ± 0,4	9,90 ± 1,70	0,05 ± 0,01	1,7 ± 0,6	9,50 ± 2,10	0,17 ± 0,03	0,6 ± 0,0	10,5 ± 0,50
R45A	0,60 ± 0,03	2,2 ± 0,3	17,0 ± 2,10	0,63 ± 0,04	1,9 ± 0,2	17,2 ± 2,30	0,60 ± 0,03	2,0 ± 0,2	40,0 ± 2,30
R45E	n.a.								
R45Q	0,72 ± 0,10	1,7 ± 0,3	14,6 ± 1,40	0,63 ± 0,04	2,6 ± 0,4	12,7 ± 0,60	0,15 ± 0,01	2,2 ± 0,4	14,9 ± 0,40
R45K	0,39 ± 0,05	1,7 ± 0,3	1,90 ± 0,10	0,51 ± 0,01	2,4 ± 0,1	1,84 ± 0,02	0,14 ± 0,02	3,1 ± 0,9	3,50 ± 1,20
R45L	0,22 ± 0,01	2,4 ± 0,4	12,6 ± 1,30	0,24 ± 0,02	2,5 ± 0,2	11,9 ± 2,10	0,24 ± 0,02	2,2 ± 0,3	12,2 ± 0,80

Wt, enzima tipo salvaje; n.a. no se detectó actividad de la enzima.

R. 3. 2.- Efecto de las sustituciones aminoacídicas sobre los parámetros cinéticos de regulación alostérica de las ADPGlc PPasas mutadas

Sustituciones en la posición 32

Estudios previos en nuestro laboratorio (Gomez Casati et al., 2001) sugirieron que la arginina en la posición 32 podría ser importante para incrementar la afinidad aparente de la enzima por Fru 6P. Para determinar su importancia, estudiamos el comportamiento de las distintas mutantes sobre la regulación alostérica, en presencia de los activadores Fru 6P y piruvato. En presencia de Fru 6P, se observaron comportamientos diferentes entre las distintas mutantes. En este sentido, la proteína R32K tuvo un valor de $A_{0.5}$ para el activador Fru 6P, similar a la proteína tipo salvaje (Figura 2. 10 A), mientras que las enzimas R32L y R32S tuvieron valores de $A_{0.5}$ mayores que la proteína salvaje (Tabla 2. 6) y similares a la enzima R32A (Gomez Casati et al., 2001). Por otra parte, la presencia de Fru-6P no tuvo efecto sobre la activación de la enzima R32Q. Sin embargo, el efecto más drástico se observó para la enzima R32E, en la cual, la presencia de Fru 6P tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima (Tabla 2. 6). Las V_{max} de las enzimas R32S, R32L, R32K fueron menores comparadas con la de la enzima tipo salvaje (Tabla 2. 6).

En presencia de piruvato, los valores de $A_{0.5}$ fueron similares para todas las mutantes excepto para R32L y R32E que tuvieron valores de $A_{0.5}$ mayores que para la enzima salvaje. Los valores de V_{max} para todas las enzimas mutadas fueron menores que la de las enzimas tipo salvaje y R32A (Gomez Casati et al., 2001) (Tabla 2. 6).

Por otra parte, también se examinó el efecto de las mutaciones sobre la inhibición por Pi. La ADPGlc PPasa tipo salvaje de *A. tumefaciens* se inhibe un 50 % en presencia de 1 mM Pi (Gomez Casati et al., 2001). Este resultado también se observó para la enzima R32K mientras que el resto de las mutantes fueron más sensibles al efecto inhibitorio del Pi (inhibición entre 90-70%). Esta inhibición sólo pudo ser revertida completamente en las enzimas salvaje y R32K (dato no mostrado).

Es importante destacar que la mutante R32K, si bien presenta una similitud en la región N-terminal con la enzima de *E. coli* (KRAKPAV), no se activó por Fru 1,6bisP, el activador específico de la enzima de *E. coli* (dato no mostrado).

Sustituciones en las posiciones 33 y 45

El efecto de las mutaciones en las posiciones R33 y R45 sobre la cinética de activación por Fru 6P y piruvato se muestran en la Tabla 2. 6. En la Figura 2. 10 se muestra el nivel de activación de las enzimas mutadas en la posición 33 y 45. Todas las enzimas mutadas en ambas posiciones fueron completamente insensibles a la activación por Fru 6P, tal como se describió para las enzimas R33A y R45A (Gomez Casati et al., 2001). En presencia de Fru 6P, los valores de V_{max} para todas las enzimas mutadas fueron menores comparados con la enzima salvaje (Tabla 2. 7).

Por otra parte, la afinidad hacia piruvato varió entre las enzimas modificadas. En este sentido, R33Q tuvo una afinidad similar a la enzima salvaje, mientras que la afinidad para R33K, R45A y R45K disminuyó, con valores de $A_{0.5}$ entre 2,4 y 7 veces comparado con la afinidad del piruvato por la enzima tipo salvaje (Tabla 2. 7). Por otra parte, la afinidad para las mutantes R45Q y R45L disminuyó significativamente

con valores de $A_{0,5}$ entre 15 y 30 veces mayores que para la enzima salvaje (Tabla 2. 7).

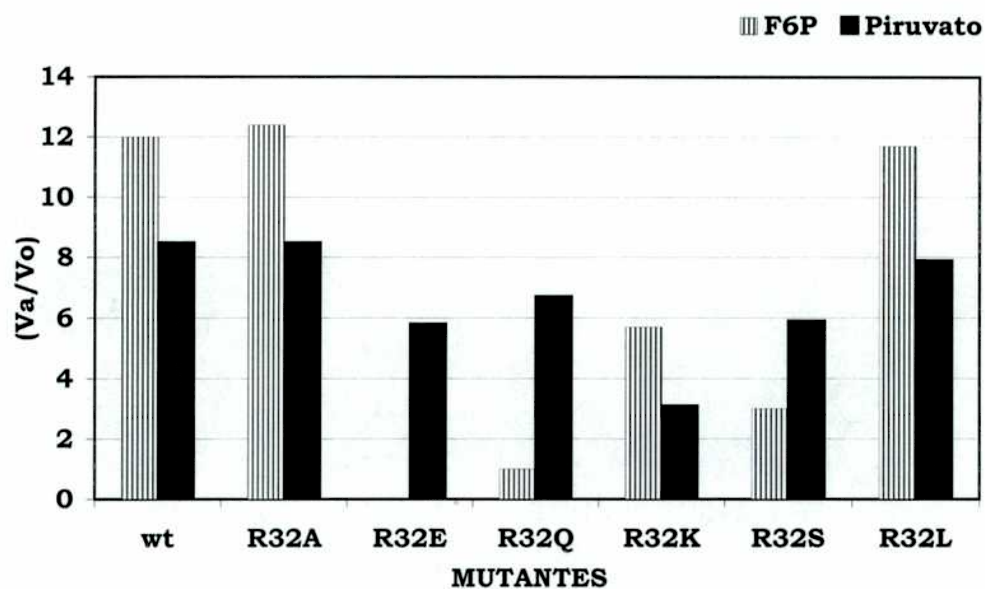
Los efectos más marcados en la posición 33 se observaron con un cambio de arginina por el ác. glutámico (R33E) que está negativamente cargado, o por un residuo neutro como serina (R33S). Estas dos enzimas fueron insensibles a la activación por piruvato (Tabla 2. 7). La enzima R33A tuvo mayor afinidad por piruvato y una V_{max} similar a la enzima salvaje (Gomez Casati et al., 2001). La V_{max} para la enzima R45L también fue similar a la enzima salvaje. Por el contrario, las V_{max} de las otras enzimas mutadas fueron menores, con valores entre 2,8 y 46 U/mg (Tabla 2. 7).

Es interesante comparar a esta altura, las diferencias de comportamiento que tienen las enzimas mutadas respecto a la afinidad que presentan por la Fru 6P. La arginina en la posición 32 puede ser reemplazada por lisina dando lugar a una enzima que continúa siendo activada por Fru 6P (Tabla 2. 7). Por el contrario, cualquier modificación que reemplace la arginina en la posición 33 o 45 genera enzimas que son insensibles a la activación por Fru 6P. (Gomez Casati et al., 2001; Tabla 2. 7). Estos resultados indican que la presencia de los residuos de arginina en las posiciones 33 y 45 es importante para la activación por Fru 6P mientras que en la posición 32 es más importante conservar la carga positiva, en lugar de la presencia de un residuo específico, para mantener la afinidad por la Fru 6P.

En la Figura 2. 11 comparamos el efecto de un cambio de carga en la cinética de activación de la ADPGlc PPasa en presencia de los activadores Fru 6P y piruvato. La sustitución de la arginina por un aminoácido con carga negativa (ác. glutámico) tuvo efectos más drásticos sobre la afinidad de la enzima para ambos efectores. La presencia de la carga positiva de la lisina en la posición 32 es importante para mantener la afinidad por la Fru 6P. Sin embargo, este aminoácido no restaura la afinidad aparente de la enzima por piruvato, comparado con la enzima tipo salvaje (Figura 2. 11). Por el contrario, el aminoácido neutro alanina, en esa posición, pudo ser tan efectivo como la arginina para la unión del piruvato a la enzima (Gomez Casati et al., 2001).

En las posiciones 33 y 45 la carga positiva de los residuos de lisina no logró restaurar la afinidad por piruvato en las enzimas alteradas. Efectos similares se observaron para las enzimas sustituidas con un aminoácido neutro (alanina) (Tabla 2. 7).

A



B

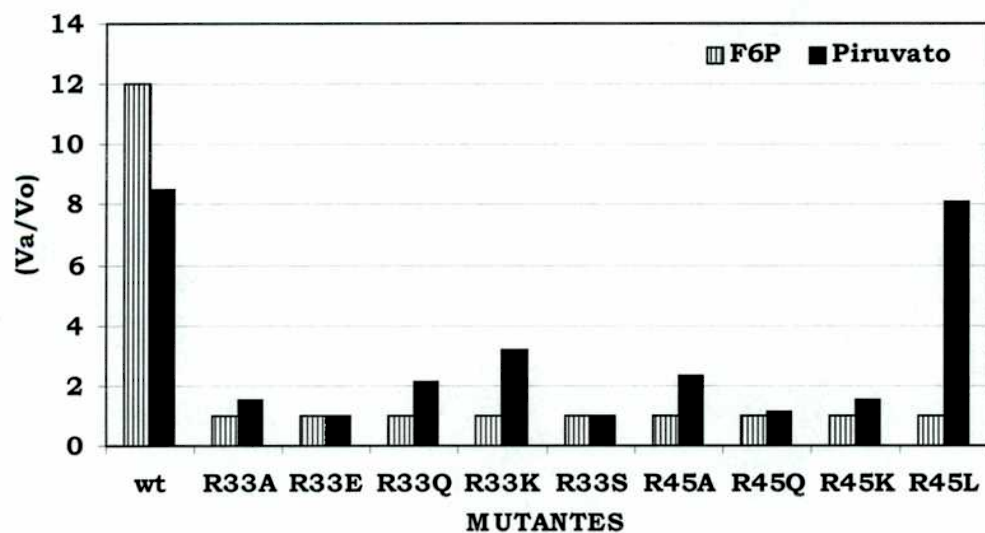


Figura 2. 10.- Nivel de activación de las enzimas de *A. tumefaciens* mutadas en las posiciones 32 (A), 33 y 45 (B); (V_a / V_o) = V_{max} con activador / V_{max} sin activador; F6P, Fru 6P; Wt, enzima tipo salvaje.

Tabla 2. 6.- Parámetros regulatorios de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* y de las enzimas modificadas en la posición 32

	Fru 6 P		Piruvato	
	A 0.5 (mM)	V _{max} (U/mg)	A0.5 (mM)	V _{max} (U/mg)
Wt	0,13 ± 0,01	140 ± 5,00	0,10 ± 0,01	102 ± 0,50
R32A	1,49 ± 0,08	139 ± 4,00	0,12 ± 0,01	100 ± 1,90
R32L	1,40 ± 0,07	61,0 ± 1,00	1,90 ± 0,30	41,0 ± 1,20
R32E	<i>I</i> _{0.5} 6,60 ± 0,40	<i>V</i> ₀ =4,50 ± 0,30	5,10 ± 0,80	23,6 ± 2,90
R32K	0,15 ± 0,01	74,4 ± 1,90	0,35 ± 0,05	40,0 ± 6,20
R32Q	n.e.	n.e.	0,17 ± 0,02	34,2 ± 3,10
R32S	1,60 ± 0,08	16,4 ± 2,70	0,17 ± 0,02	32,1 ± 4,10

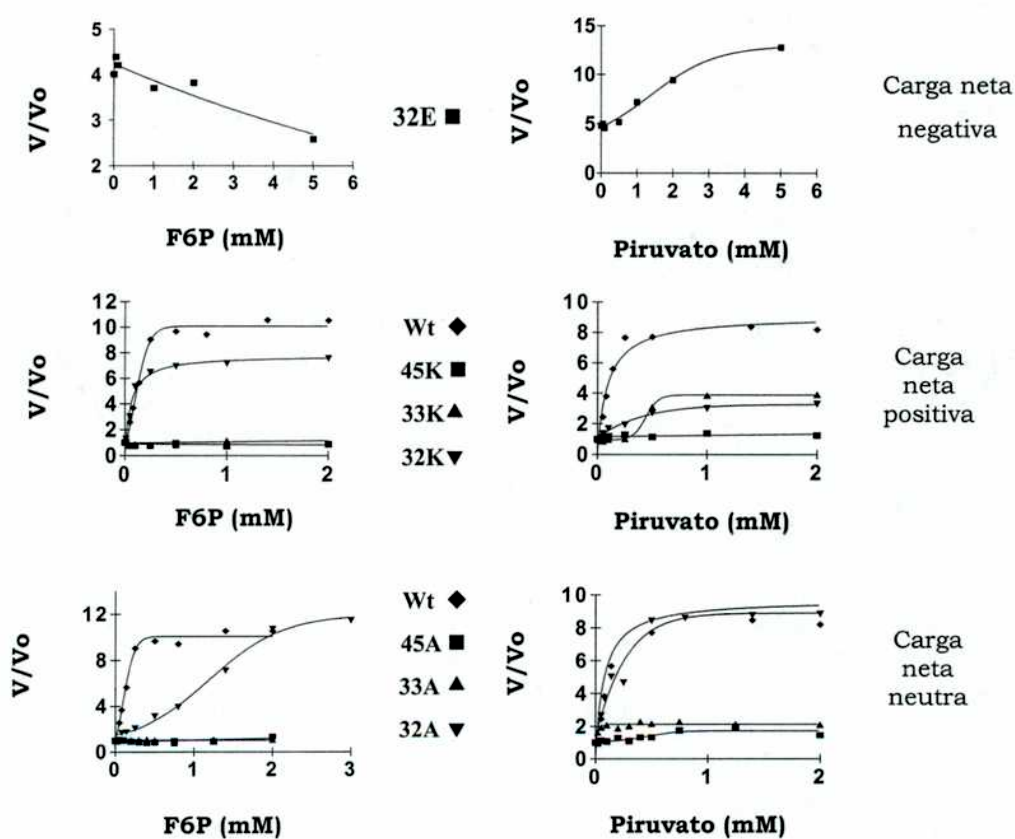
Wt, enzima tipo salvaje; n.e, la presencia del efector Fru-6P no tuvo efecto sobre la activación de la enzima *I*_{0.5}, concentración de Fru 6P necesaria para alcanzar un 50% de la actividad sin efector; *V*₀, *V*_{max} sin efector.

Tabla 2. 7.- Parámetros regulatorios de las ADPGlc PPasas de *A. tumefaciens* con distintas mutaciones en las posiciones 33 y 45

enzima	Piruvato	
	A_{0.5} (mM)	V_{max} (U/mg)
	0,10 ± 0,01	102 ± 0,50
R33A	0,02 ± 0,00	99,4 ± 1,80
R33E	n.e	39.00 ± 3.00
R33Q	0,14 ± 0,00	8,60 ± 1,20
R33K	0,38 ± 0,05	4,50 ± 0,80
R33S	n.e	12,0 ± 2,00
R45A	0,69 ± 0,09	45,9 ± 1,90
R45E	n.a.	n.a.
R45Q	1,48 ± 0,20	15,0 ± 0,50
R45K	0,26 ± 0,02	2,80 ± 1,20
R45L	3,03 ± 0,19	103 ± 2,90

Wt, enzima tipo salvaje; ne, , la presencia del efector no tuvo efecto sobre la activación de la enzima; n.a., no se detectó actividad de la enzima.

Figura 2. 11.- Cinética de activación (V_a/V_o) de las distintas enzimas de *A. tumefaciens* mutadas en las posiciones R32, 33 y 45.



(V_a / V_o) = V_{max} con activador/ V_{max} sin activador; F6P, Fru 6P; Wt, enzima tipo salvaje.

DISCUSIÓN

En la mayoría de las bacterias que utilizan glucógeno como fuente de energía y de almacenamiento de carbono, los genes estructurales relacionados con el metabolismo de dicho polisacárido, se encuentran agrupados y organizados en un operón (Galibert et al., 2001, Igarashi & Meyer, 2000, Lepek et al., 2002, Preiss & Sivak, 1998, Uttaro et al., 1998).

Por otra parte, se identificó un fragmento de ADN genómico de *B. loti* de 4,4 Kb que tiene homología con el gen *glgC* de *A. tumefaciens*. Dicho fragmento presenta una región que contiene gran parte del gen *glgC* y el gen *glgA* completo. Sin embargo, la región adyacente al gen *glgA* presenta dos marcos de lectura abiertos que codifican para proteínas que no están relacionadas con el metabolismo del glucógeno (Figuras 2. 4 y 2. 8). Este resultado sugiere que en esta especie los genes estructurales del metabolismo del glucógeno tienen una organización diferente a la reportada en otras bacterias.

Con la reciente publicación del genoma completo de *B. japonicum*, se tuvo acceso a la búsqueda e identificación de los genes estructurales de la síntesis y degradación del glucógeno en dicha especie. En este sentido, se identificaron 7 genes relacionados con dicho metabolismo (Figura 2. 5), pero los mismos no están agrupados formando un operón como se encontró en otras bacterias (Kaneko et al., 2002 a y b). En dicha especie, los genes *glgC-glgA1* y *glgB-glgX* están agrupados de a pares, mientras que los genes *glgP* y *glgA2* se encuentran aislados (Figura 2. 5). Además, llama la atención la gran separación que existe entre los mismos a lo largo del genoma (Figura 2. 5).

Por otra parte, la comparación de la región clonada del genoma de *B. loti* (Figura 2. 4) con el genoma de *B. japonicum* sugiere que al menos la organización de los genes *glgC-glgA* y los genes situados corriente abajo del gen *glgA*, que no están relacionados con el metabolismo del glucógeno, es muy similar en ambas especies de *Bradyrhizobium* (Figura 2. 5). Esta última observación y la alta homología en la secuencia nucleotídica que presentan los genes *glgC* y *glgA* en ambas especies (Tabla 2. 1), sugiere que dichos genes están muy conservados entre los miembros del género *Bradyrhizobium*. Además, la secuencia aminoacídica de la ADPGlc PPasa de *B. loti* presenta un grado de homología significativamente mayor con la enzima de *B. japonicum* (95% de homología) que con otras ADPGlc PPasas de rizobios (74 a 72 %) (Tabla 2. 1). A partir de este análisis comparativo, podemos asumir que los residuos aminoacídicos de la ADPGlc Pasa de *B. loti* del extremo N-terminal, que no obtuvimos en nuestro estudio, estarían también altamente conservados respecto a lo conocido para la enzima de *B. japonicum*.

Asimismo, la secuencia aminoacídica de las GS de *B. loti* presenta un alto grado de homología con la enzima de *B. japonicum*, mientras que difiere de manera significativa con las otras GS bacterianas analizadas (Tabla 2. 1). Estos resultados reflejan que ambas enzimas, las ADPGlc PPasas y las GS se encuentran altamente conservadas dentro del género *Bradyrhizobium*.

Las ADPGlc PPasas de bacterias se han agrupado en siete clases diferentes según la especificidad que poseen por los activadores, que a su vez está relacionada con la vía principal de asimilación del carbono que utiliza el organismo (Iglesias & Preiss, 1992). Estudios de caracterización de la enzima de *A. tumefaciens*, que está regulada positivamente por Fru 6P y piruvato y en menor medida por Fru 1,6 bisP (Uttaro et al., 1998), y pertenece a la clase IV (Tabla 3, sección 2. 2. 2. 1. de Introducción General), (Iglesias & Preiss, 1992). Este organismo pertenece a la

familia *Rhizobiaceae* y está estrechamente relacionado con bacterias que establecen simbiosis con leguminosas. En este sentido, las mediciones de actividad de la ADPGlc PPasa de *B. loti* determinaron que esta enzima también es activada principalmente por Fru 6P y piruvato, de manera similar a la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens*, como correspondería a bacterias que están cercanas desde un punto de vista evolutivo. Basándonos en estas características regulatorias, la ADPGlc PPasa de *B. loti* forma parte de la clase V como la enzima de *R. sphaeroides*, en lugar de agruparse con la enzima de *A. tumefaciens*. Estos resultados también están de acuerdo con las vías de asimilación del carbono que operan en bacterias del género *Bradyrhizobium* (Embden Meyerhof-Parnas, (EMP), Entner Doudoroff (ED) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Anand & Dogra, 1991). Estas vías también son utilizadas por *R. sphaeroides* y otras bacterias cuyas ADPGlc PPasas están agrupadas en la clase V. Las ADPGlc PPasas de este grupo están altamente reguladas por Fru 6P, Fru 1,6 bisP y piruvato. Se ha postulado que la amplia gama de reguladores que tiene esta clase de ADPGlc PPasas, es consecuencia de la habilidad que tienen los organismos de la cual provienen, para crecer en distintas condiciones ambientales (Choudhary et al., 1999).

Si tenemos en cuenta los distintos ambientes que colonizan las bacterias del género *Bradyrhizobium*, los resultados obtenidos están de acuerdo con la versatilidad que presentan estos microorganismos para utilizar distintas fuentes carbonadas. Estas bacterias cuando se encuentran en vida libre utilizan diferentes compuestos como fuente de carbono y energía (Fulchieri et al, 2001) y mantienen activas las tres vías mencionadas anteriormente para metabolizar los compuestos carbonados pero cuando establecen una simbiosis con leguminosas específicas y se encuentran dentro del nódulo utilizan casi exclusivamente ác. carboxílicos como fuente de carbono (Allaway, 2000) y la principal vía que utilizan para metabolizar dichos compuestos es el ciclo del TCA.

Por otra parte, hasta el momento no se conocen trabajos en los cuales se haya medido directamente glucógeno dentro del nódulo así como tampoco se ha medido la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de glucógeno en bacteroides. Nuestros resultados demuestran que la actividad de ADPGlc PPasa en bacteroides de *B. japonicum* aumenta con la maduración del nódulo, y es mayor a los 38 días post-inoculación (Tabla 2. 3). Las mediciones de nitrogenasa sugieren que en esta etapa, el bacteroide continúa fijando nitrógeno atmosférico. Estos estudios sugieren que el bacteroide es capaz de sintetizar glucógeno en estadios avanzados de la ontogenia del nódulo mientras mantiene su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

Trabajos realizados en nódulos de soja determinaron que los bacteroides sobreviven a la senescencia de los nódulos (Müller et al., 1994). Estos bacteroides acumularon altos niveles de trealosa luego de 32 días post-infección y se ha postulado que dicho disacárido podría ser utilizado como fuente de carbono y energía para sobrevivir dentro del nódulo (Müller et al., 1994). También se ha sugerido que la presencia de trealosa permite a la bacteria adaptarse al entorno hiperosmótico (Pfeffer, et al;1994). Aunque no se conoce aún como se sintetiza la trealosa en los nódulos, se ha descubierto que los rizobios sintetizan trealosa a partir de la degradación de glucógeno (Streeter and Bhagwat, 1999). En este sentido, teniendo en cuenta el aumento significativo de la actividad de ADPGlc PPasa bacteriana en nódulos maduros, es probable que la síntesis de trealosa ocurra por esta última vía en los bacteroides.

Por otra parte, estudios de modificación química y mutagénesis sitio-dirigida en la región N-terminal de las ADPGlc Pasas, indican que la lisina-39 está

involucrada en la unión de la enzima de *E. coli* al activador Fru 1,6 bisP. También se determinó que los residuos de arginina de esta región son importantes en la regulación alostérica de las ADPGlc PPasas de *R. sphaeroides* (Igarashi & Meyer, 2000) y *A. tumefaciens*, que son reguladas positivamente por Fru 6P y piruvato (Gomez Casati et al., 2001). En este sentido se utilizó como modelo experimental la enzima de *A. tumefaciens* para identificar regiones regulatorias involucradas en la activación por Fru 6P y piruvato. Para establecer el rol específico de las argininas en dichas regiones, se analizó el efecto de diferentes sustituciones de arginina en las posiciones 32, 33 y 45 de esta enzima.

En primer lugar, analizamos las sustituciones de arginina en la posición 32. Nuestros resultados indican que la presencia de una carga positiva en esta posición parece ser necesaria para la activación por Fru 6P. Si se modifica la arginina por una lisina, no se altera la afinidad aparente por Fru 6P (Tabla 2. 5). Sin embargo, cualquier modificación por otro aminoácido en esa posición, que altere el tamaño o la hidrofobicidad, reduce la afinidad aparente por Fru 6P (Tabla 2. 5). En este sentido, es interesante el comportamiento que se observa con la enzima mutada R32E, en la cual se reemplazó la arginina por un residuo con carga negativa, y resultó inhibida por Fru 6P (Figura 2. 11). Este comportamiento fue más drástico comparado con el que presentó la mutante de *E. coli* en la misma posición (K39E), en la cual el valor de $A_{0.5}$ para el activador Fru 1,6 bisP fue 20 veces mayor comparada con la enzima tipo salvaje (Gardiol & Preiss, 1990).

Si analizamos el comportamiento de la enzima R32K vemos que conserva la afinidad aparente por Fru 6P de manera similar a la enzima salvaje. Hay que tener en cuenta que esta mutante no se activa por Fru 1,6 bisP, el activador de la enzima de *E. coli*, aunque presenta los mismos aminoácidos entre las posiciones 32 y 38 (KRAKPAV). Este resultado sugiere que este único cambio no es suficiente y que probablemente se requiera de otro(s) residuo(s) que están presentes en las enzimas de *E. coli* para la activación de la enzima de *A. tumefaciens* por Fru 1,6 bisP.

Por otra parte, si se analiza el comportamiento de las otras enzimas mutadas de *A. tumefaciens* en la posición 32 en presencia de piruvato, se observa que la mayoría de las enzimas modificadas tienen un comportamiento similar a la enzima tipo salvaje, excepto para aquellas que tuvieron una sustitución de ac. glutámico o leucina. Ambas enzimas alteradas tuvieron una reducida afinidad por piruvato, pero un cambio por un residuo cargado negativamente (ac. glutámico) tuvo efectos más drásticos que el cambio por un residuo hidrofóbico (leucina) (Tabla 2. 5). Estos resultados refuerzan lo previamente propuesto respecto a que no existiría identidad entre el sitio de unión del activador Fru 6P y el piruvato en la enzima de *A. tumefaciens* (Gomez Casati et al., 2001).

Si bien el comportamiento de estas mutantes fue diferente respecto a la afinidad aparente por cada activador, la sustitución por ac. glutámico en esta posición tuvo efectos más drásticos que cualquier otra modificación (Figura 2. 11). En ese sentido, estos resultados sugieren que una carga positiva en la posición 32 sería necesaria para mantener la afinidad aparente de las ADPGlc PPasas activadas por azúcares-fosfato y/o piruvato.

Esta hipótesis también es apoyada por las diferencias que existen en la región RRAKPAV con enzimas que tienen sustituciones no-conservativas tales como asparagina (N) en *B. stearothermophilus* (NIAKPAV), o leucina (L) en *Anabaena* (LRAKPAV), que eliminan una carga positiva en esa región y no están activadas por azúcares-fosfato (Igarashi & Meyer, 2000).

Estudios previos realizados con la enzima R33A habían sugerido que la presencia de arginina en la posición 33 podría ser importante para la activación de

la enzima por Fru 6P (Gomez Casati et al., 2001). En este sentido, los resultados presentados en esta tesis apoyan esa primera evidencia ya que todas las enzimas modificadas en esa posición fueron completamente insensibles a la activación por Fru 6P (Figura 2. 10B).

La enzima R33A tuvo una actividad incrementada en ausencia del activador Fru 6P. Este mismo comportamiento se observó con la mutante R33E (carga negativa) (Tabla 2. 6). Este comportamiento sugiere que ambas enzimas están bloqueadas en una conformación que les permite estar continuamente activadas (estado R de acuerdo al modelo alostérico de Monod y col. (Monod et al., 1963)).

Contrariamente a lo observado para Fru 6P, en presencia de piruvato el comportamiento cinético de todas las mutantes fue similar al de la enzima tipo salvaje, excepto para las enzimas R33E (carga negativa) y R33S (grupo hidrofílico). La modificación de arginina por cualquiera de estos dos aminoácidos dio como resultado enzimas mutadas que son insensibles a piruvato.

Si bien el comportamiento de las mutantes respecto a los activadores fue diferente, la activación por Fru 6P se afectó de manera más drástica que la activación por piruvato (Figura 2. 10 A y B). Estos resultados sugieren que la presencia de arginina en la posición 33 es muy importante para la activación de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* y no podría ser reemplazada por otro aminoácido. La presencia de arginina también se ha determinado que es importante para la unión de Fru 6P a F6P2-kinasa: fructosa 2,6-difosfatasa (Mizuguchi et al., 1997) y fosfofructokinasa pirofosfato-dependiente (Deng, 2000).

Además, es significativo el hecho de que existen variantes de ADPGlc PPasas que no tienen arginina en esta posición (la enzima de *R. rubrum* tiene ácido glutámico y la de *B. stearothermophilus* tiene isoleucina) y estas enzimas son insensibles a la activación por azúcares-fosfato y a la inhibición por Pi (Igarashi & Meyer, 2000).

Por otra parte, si bien la activación por piruvato no tuvo el mismo efecto que la activación por Fru 6P para todas las mutantes ensayadas en este trabajo, la insensibilidad que mostraron las enzimas R33E y R33S hacia ambos activadores sugiere que esta posición podría formar parte de ambos sitios de activación, o bien encontrarse próxima a los mismos. Además, esta posición formaría parte de una región expuesta (Preiss, 1996) que sería accesible a la modificación con PGO. En ese sentido, cualquier modificación drástica en esta región podría afectar la conformación de esa posición y evitar la correcta unión de cada activador a su respectivo sitio.

Estudios previos de modificación química de argininas con PGO indicaron la presencia de poblaciones funcionales de estos residuos, que están localizados en subsitios diferentes con diferentes sensibilidades y/o acceso al PGO (Gomez Casati et al., 2001). El nivel diferente de desensibilización hacia Fru 6P y piruvato que presentaron las enzimas modificadas en presencia de PGO fue una primera evidencia de que podrían existir subsitios diferentes para cada activador (Gomez Casati, et al., 2001). En un trabajo publicado recientemente, se caracterizaron dos ADPGlc PPasas quiméricas, híbridas entre las enzimas de *E. coli* y *A. tumefaciens* y se evidenció la importancia del extremo C-terminal para la especificidad de unión de los respectivos efectores alostéricos. Se determinó que la presencia del C-terminal de la enzima de *A. tumefaciens* no estaría involucrado en la activación por Fru 6P sino que sería importante para la activación por piruvato (Ballicora et al., 2002; Gomez Casati et al., 2001). Estos resultados apoyan la hipótesis antes mencionada, sobre la presencia de subsitios separados en la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens*, para los activadores Fru 6P y piruvato (Gomez Casati et al., 2001). Por otra parte, los estudios con enzimas quiméricas determinaron que el extremo C-terminal de la

ADPGlc PPasa de *E. coli* es importante para la unión del activador Fru 1,6 bisP (Ballicora et al., 2002). Dado que se encontró previamente que la lisina 39 es importante para la activación de la enzima de *E. coli* por Fru 1,6 bisP (Gardiol & Preiss, 1990), es probable que la regulación por este efector esté determinada por la interacción entre ambos extremos N y C-terminales. Esta interacción permitiría que la enzima adopte una estructura tridimensional adecuada que permita la unión óptima con el modulador alostérico (Ballicora et al., 2002).

Por otra parte, nuestros resultados con las enzimas mutadas en la posición 45 fueron similares a las obtenidas con las modificaciones en la posición 33 respecto a la activación por Fru 6P. Todas las mutantes fueron insensibles a la activación por Fru 6P y las enzimas R45Q y R45L mostraron una afinidad aparente menor por piruvato. Este comportamiento diferente hacia ambos activadores sugiere que la arginina en esta posición es importante para la activación de la enzima por Fru 6P. Sin embargo, es poco probable que desempeñe un rol directo en la unión de un efector particular, ya que está completamente conservada entre todas las ADPGlc PPasas bacterianas analizadas.

A partir de este trabajo, podemos concluir que los residuos de arginina en las posiciones 32, 33 y 45 de la región N-terminal de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* son importantes para la regulación de la enzima por Fru 6P y piruvato. El alto grado de conservación de las secuencias RRAKPAV en las ADPGlc PPasas de rizobios y la característica común de activarse en presencia de Fru 6P y piruvato, al menos para las enzimas de *B. loti* y *A. tumefaciens*, sugiere que el rol que desempeñan las distintas argininas de la enzima de *A. tumefaciens* en la regulación alostérica podría ser similar en otras ADPGlc PPasas que están reguladas por Fru 6P y piruvato.

Es importante destacar que dado que hasta el momento no se tiene información acerca de la estructura tridimensional de ninguna ADPGlc PPasa, el estudio del comportamiento de las distintas enzimas mutadas a través de la sustitución de diferentes argininas por otros residuos nos permite aproximarnos de manera indirecta a los cambios estructurales que ocurren en la enzima para tratar de establecer el rol de determinados residuos en el comportamiento alostérico de la enzima y nos permite comprender de una manera más detallada el mecanismo molecular de activación de la enzima.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se identificó un fragmento de ADN genómico de *B. loti* de 4,4 Kb que tiene homología con el gen *glgC* de *A. tumefaciens*. Dicho fragmento presenta una región que contiene gran parte del gen *glgC* y el gen *glgA* completo, que codifican para las enzimas ADPGlc PPasa y GS respectivamente.
- El análisis de la región adyacente al gen *glgA* reveló que en el genoma de *B. loti* NZP 2309, los genes estructurales del metabolismo del glucógeno tienen una organización diferente a la reportada en otras bacterias.
- La región clonada de *B. loti* que tiene los genes *glgC-glgA* y otros genes situados corriente abajo del gen *glgA*, no relacionados con el metabolismo del glucógeno, es similar a una región presente en el genoma de *B. japonicum*.
- Las secuencias aminoacídicas de la ADPGlc PPasa y GS de *B. loti* presentan un grado de homología significativamente mayor con las enzimas de *B. japonicum* que con otras enzimas homólogas de rizobios, reflejando un alto grado de conservación de las mismas dentro del género *Bradyrhizobium*.
- La ADPGlc PPasa de *B. loti* pertenece al grupo V de ADPGlc PPasas que están altamente reguladas ya que se activan por Fru 6P, Fru 1,6 bisP y piruvato.
- La actividad de ADPGlc PPasa en bacteroides de *B. japonicum* aumenta con la maduración del nódulo, y es mayor a los 38 días post-inoculación, cuando los nódulos todavía tienen actividad reductora de acetileno.
- La ADPGlc PPasa de *B. loti*, *R. sphaeroides* y *A. tumefaciens* se activan por Fru 6P y piruvato y comparten regiones regulatorias similares ricas en residuos de arginina, que están involucradas en la activación por dichos metabolitos.
- El comportamiento de las mutantes de *A. tumefaciens* en la R32 fue diferente respecto a la afinidad aparente por los activadores Fru 6P y piruvato pero la sustitución por ac. glutámico tuvo efectos más drásticos que cualquier otra modificación
- La presencia de una carga positiva en la posición 32 parece ser necesaria para la activación por Fru 6P y cualquier modificación de arginina por otro aminoácido que altere el tamaño o la hidrofobicidad, reduce la afinidad aparente por Fru 6P.
- La mutante R32K de *A. tumefaciens* no se activa por Fru 1,6 bisP, (el activador de la enzima de *E. coli*) aunque presenta los mismos aminoácidos entre las posiciones 32 y 38 (KRAKPAV) que la enzima de *E. coli*. Este comportamiento está de acuerdo con otros estudios que demuestran que el extremo C-terminal cumple una función crítica en la especificidad por el activador (Ballicora et al., 2002).

- Una carga positiva en la posición 32 sería necesaria para mantener la afinidad aparente de las ADPGlc PPasas activadas por azúcares-fosfato y/o piruvato
- El comportamiento de las mutantes en la posición 33 respecto a los activadores fue diferente, afectándose de manera más drástica la activación por Fru 6P que la activación por piruvato.
- La presencia de arginina en la posición 33 es muy importante para la activación de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* por Fru 6P y no podría ser reemplazada por otro aminoácido.
- La presencia de arginina en la posición 45 es importante para la activación de la enzima por Fru 6P pero es poco probable que desempeñe un rol directo en la unión de un efector particular, ya que está completamente conservada entre todas las ADPGlc PPasas bacterianas analizadas.
- Las distintas mutantes de las posiciones 32, 33 y 45 de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* indican que no hay una identidad completa entre el sitio de unión de Fru 6P y de piruvato a la enzima.

Comentario General y Perspectivas Futuras

El trabajo presentado en esta tesis, se centró en aspectos relacionados con el metabolismo de polisacáridos estructurales y de reserva en bacterias que interaccionan con plantas. Específicamente se realizaron estudios sobre la estructura y biosíntesis de glucanos cíclicos en rizobios que interaccionan con *Lotus* spp. Por otra parte, se caracterizaron los reguladores alostéricos de la ADPGlc PPasa de *B. loti* y se identificó una región del genoma de este rizobio, que contiene genes relacionados con la síntesis de glucógeno. Además se realizaron estudios de mutagénesis sitio-dirigida en la ADPGlc Pasa de *A. tumefaciens*, para determinar el rol de residuos específicos de arginina que están relacionados con la regulación alostérica.

El principal objetivo de tales estudios fue contribuir al conocimiento básico del metabolismo de los polisacáridos en estas bacterias. Con estos conocimientos se buscó obtener información para la mejor comprensión del rol que desempeñan estos polisacáridos, en la interacción rizobio-leguminosa.

Los resultados obtenidos con el estudio de los glucanos cíclicos, aportaron evidencias sobre la estructura y mecanismos de síntesis de dichos compuestos en rizobios que participan específicamente en la interacción rizobio-*Lotus* spp. Se demostró que la estructura química de los glucanos cíclicos, si bien es diferente entre las cepas de *M. loti* y *B. loti*, no está relacionada con el rango de nodulación con los distintos hospedantes. Por otra parte, se determinó que la estructura de los glucanos cíclicos de *B. loti* presenta diferencias respecto a la de *B. japonicum*, que había sido previamente reportada. En este último organismo, se han clonado y caracterizado dos genes estructurales relacionados con la síntesis de glucanos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, y mediante la obtención de mutantes en dichos genes, se alteró la estructura del glucano, afectando la capacidad de invasión del rizobio en los nódulos. En este sentido, sería importante identificar los genes homólogos en el genoma de *B. loti*, para obtener mutantes en la síntesis de glucanos y evaluar la importancia de la estructura de estos polisacáridos en la interacción rizobio-*Lotus* sp. Asimismo, la posibilidad de obtener mutantes nulas de *B. loti*, para la síntesis de glucanos permitiría realizar ensayos de complementación con los genes homólogos de *B. japonicum*, para determinar si se modifica la estructura del glucanos que produce dicha mutante y si se afecta la capacidad de invasión de los nódulos en su hospedante habitual. Estos ensayos permitirían evaluar si existe una relación entre la estructura de los glucanos y la capacidad de invasión en las cepas de *Bradyrhizobium*. Además, estos estudios aportarían nuevas evidencias acerca del complejo mecanismo de biosíntesis de estos glucanos.

Por otra parte, los estudios realizados sobre la regulación de la ADPGlc PPasa constituyen un aporte al conocimiento básico del metabolismo del glucógeno y además, tienen particular interés teniendo en

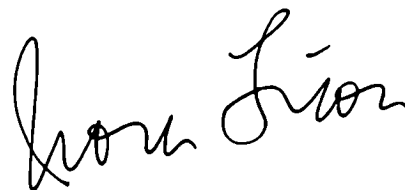
cuenta que la ADPGlc PPasa es el principal punto de control que determina la tasa de acumulación de glucógeno en bacterias. Dado que es escasa la información que existe sobre esta enzima en rizobios, y que aún no se conoce el rol que desempeña el glucógeno durante la simbiosis, resulta relevante el aporte realizado sobre este tema. En estos estudios, se identificaron los metabolitos que activan la ADPGlc PPasa en *Bradyrhizobium*. Las mediciones de actividad de esta enzima en bacteroides indican que hay un aumento de la síntesis de glucógeno en nódulos maduros. Los resultados sugieren que la síntesis de glucógeno estaría relacionada con la supervivencia del bacteroide en los últimos estadios del nódulo. Por otra parte, se determinó que las ADPGlc PPasas reguladas positivamente por Fru 6P y piruvato, comparten regiones regulatorias similares, ricas en residuos de arginina, que están involucradas en la activación por dichos metabolitos. Estos residuos están localizados en la región N-terminal de la enzima y se encuentran altamente conservados en las ADPGlc PPasas reguladas por Fru 6P y piruvato. Para este trabajo, se tomó como modelo de estudio la enzima de *A. tumefaciens* con el objeto de comprender el mecanismo molecular de activación de esta y otras ADPGlc PPasas (ADPGlc Pasa de *B. loti* y de *R. sphaeroides*), que presentan propiedades regulatorias similares. El comportamiento cinético de las distintas mutantes de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* reveló que es necesaria la presencia de una carga positiva en la posición 32 para mantener la afinidad aparente de las ADPGlc PPasas activadas por azúcares-fosfato y/o piruvato y que la presencia de arginina en las posiciones 33 y 45 es esencial para la activación por Fru 6P. Estos resultados pueden ser utilizados para modificar las propiedades regulatorias de otras ADPGlc PPasas que tienen características similares. En este sentido, estos conocimientos aplicados a la ADPGlc PPasa de *B. loti* servirían para obtener mutantes con alteraciones en las propiedades regulatorias y en consecuencia, con distinta capacidad de síntesis y acumulación de glucógeno. Los ensayos de nodulación entre dichas mutantes y su leguminosa habitual serían particularmente útiles para evaluar el rol del glucógeno durante la simbiosis.



María Julia Estrella



Dr. Alberto A. Iglesias



Dra. Nora Iñón de Iannino

Metabolismo de α y β -glucanos en bacterias que interaccionan con plantas

Resumen

Las bacterias sintetizan y acumulan diferentes polisacáridos de tipo α y β , los cuales cumplen funciones relevantes en la adaptación a los distintos entornos ambientales y en la interacción de las mismas con otros organismos. Los estudios que realizamos se refirieron específicamente al metabolismo de los glucanos cíclicos y del glucógeno en bacterias del suelo que interaccionan con plantas. Una parte del trabajo estuvo orientada a conocer el tipo de glucano que producen los rizobios que establecen simbiosis con el género *Lotus*. En dichos estudios se estableció que los glucanos cíclicos producidos por la cepa *B. loti* NZP 2309 tienen el mismo tipo de unión y estructuras estrechamente relacionadas con los descritos previamente en *B. japonicum* USDA 110, aunque la estructura de la especie mayoritaria de cada cepa es diferente. La cepa *B. loti* NZP 2309 produce una mezcla de glucanos cíclicos con uniones $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$, que están formados por especies neutras, no sustituidas, con DP= 10, 11 y 12, y la especie cíclica mayoritaria está ramificada, tiene un DP=11 y está formada por un anillo de 10 residuos de glucosa con un único residuo terminal que forma la rama. La proporción de enlaces glucosídicos que tiene este glucano cíclico es 3:7:1 para las uniones $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3, 6)$ respectivamente. La comparación de los glucanos cíclicos producidos por las cepas de *B. loti* NZP 2309 y *B. japonicum* USDA 110, sugiere que dichas moléculas tienen propiedades hidrofóbicas diferenciales y distinta capacidad de unión con flavonoides de leguminosas. Por otra parte, se observó que ambas cepas de *Bradyrhizobium* sintetizan *in vitro*, glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ por mecanismos similares y que dichos glucanos están estructuralmente relacionados. En *B. loti* NZP 2309 se identificó una proteína de membrana interna de 85 kDa que podría estar involucrada en la síntesis de glucanos solubles $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$; insolubles $\beta(1-3)$ tipo laminarina, o en la síntesis de ambos compuestos. Las moléculas sintetizadas *in vitro* están formadas principalmente por enlaces $\beta(1-3)$, mientras que las moléculas producidas *in vivo* tienen mayor proporción de enlaces $\beta(1-6)$. Nuestros resultados sugieren que la síntesis de glucanos cíclicos $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$ en *Bradyrhizobium* sp podría involucrar la formación de un glucano cíclico con uniones $\beta(1-3)$, al que posteriormente se introducen uniones $\beta(1-6)$ por transglucosilación, a través de la proteína NdvC. Además, determinamos y comparamos el tipo de glucano que sintetizan y acumulan dos cepas de colección de *M. loti*, y evaluamos si la estructura de los mismos está relacionada con la capacidad que tienen dichas cepas para nodular distintas especies de *Lotus*. Se determinó que las cepas *M. loti* NZP 2213 y NZP 2037 producen glucanos cíclicos neutros y sustituidos con residuos aniónicos y uniones $\beta(1-2)$, los que son similares a los reportados en otros rizobios de crecimiento rápido. La síntesis de los glucanos de *M. loti* se realiza a través de una proteína intermediaria que tiene una masa molecular similar a la proteína de 319 kDa reportada en otros rizobios que sintetizan glucanos cíclicos $\beta(1-2)$. Se estableció que el tipo de glucano producido por las cepas *M. loti* NZP 2213, NZP 2037 y *B. loti* NZP 2309 no está relacionado con el rango de hospedante, ya que se determinó que las dos especies de *M. loti* producen glucanos similares con el mismo tipo de unión y presentan distinto rango

de nodulación. Además, se observó que dos cepas con distinto tipo de glucano forman nódulos efectivos en una misma especie de *Lotus*. Otra parte de la tesis se centró en el metabolismo del glucógeno en bacterias que interaccionan con plantas. Se clonó y caracterizó un fragmento de ADN genómico de *B. loti* que tiene homología con el genes de la síntesis de glucógeno y que contiene gran parte del gen *glgC* y el gen *glgA* completo, que codifican para las enzimas ADPGlc PPasa y GS, respectivamente. El fragmento clonado es similar a una región presente en el genoma de *B. japonicum*, indicando que la organización de los genes estructurales del metabolismo del glucógeno en el género *Bradyrhizobium* está conservada y es diferente a la reportada en otras bacterias. Las secuencias aminoacídicas de la ADPGlc PPasa y GS de *B. loti* presentan un grado de homología mayor con las enzimas de *B. japonicum* que con otras enzimas homólogas de rizobios. La ADPGlc PPasa de *B. loti* pertenece al grupo V de ADPGlc PPasas que están altamente reguladas ya que se activan por Fru 6P, Fru 1,6 bisP y piruvato. La actividad de esta enzima en nódulos reveló que la ADPGlc PPasa de bacteroides de *B. japonicum* aumenta con la maduración del nódulo, cuando los mismos todavía tienen actividad reductora de acetileno. Por otra parte, se realizaron experimentos de mutagénesis sitio-dirigida con la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens*, que se tomó como modelo experimental, para determinar el rol que tienen los residuos de arginina que están conservados y ubicados en la región N-terminal de las ADPGlc PPasas reguladas positivamente por Fru 6P y piruvato. Se determinó que una carga positiva en la posición 32 sería necesaria para mantener la afinidad aparente de las ADPGlc PPasas activadas por hexosas-fosfato y/o piruvato y cualquier modificación de arginina por otro aminoácido que altere el tamaño o la hidrofobicidad, reduce la afinidad aparente por Fru 6P. El comportamiento de las mutantes en la posición 33 respecto a los activadores fue diferente, afectándose de manera más drástica la activación por Fru 6P que la activación por piruvato. La presencia de arginina en la posición 33 es muy importante para la activación de la ADPGlc PPasa de *A. tumefaciens* y no podría ser reemplazada por otro aminoácido. La presencia de arginina en la posición 45 es importante para la activación de la enzima por Fru 6P pero es poco probable que desempeñe un rol directo en la unión de un efector particular, ya que está completamente conservada entre todas las ADPGlc PPasas bacterianas analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña**, H. 1998. Comparación de variedades de tres especies del género *Lotus* (*L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Cav. y *L. tenuis* Wald et Kit.) en suelos de aptitud arroceras. *Agricultura Técnica* (Chile) 58:7-14.
- Agrios** GN. 1997. *Plant Pathology*. (4th ed). Academic Press, San Diego, California, USA.
- Alexopoulos** CJ; Mims CW & Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology* (edited by John Wiley & Sons) Inc, New York.
- Allaway** D; Lodwig E; Crompton LA; Wood M; Parsons TR; Wheeler T & Poole PS. 2000. *Mol Microbiol*, 36: 508-515.
- Allen** ON & Allen EK. 1981. *The leguminosae. A sourcebook of characteristics, uses, and nodulation*. Univ. of Wisconsin Press Madison.
- Altabe** SG, Talaga P, Wieruszeski JM, Lippens G, ugalde R & Bohin JP. 1998. In: *Biological Nitrogen Fixation for the 21 st Century*. (edited by Elmerich C, Kondorosi A & Newton WE) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Altabe** S, Iñón de Iannino N, de Mendoza D & Ugalde R A. 1990. *J Bacteriol*, 176: 4890-4898.
- Altschul** S F, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ. 1997. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-3402
- Amemura** A & Cabrera-Crespo J. 1986. *J Gen Microbiol*, 132: 2443-2452.
- Amemura** A. 1984. *Agric Biol Chem*, 48: 1809-1817.
- Anand** RC & Dogra RC. 1991. *J Appl Bacteriol*, 70: 197-202.
- Anand** RC & Dogra RC. 1997. *Biol Fertil Soils*, 24: 283-287.
- Appleby** CA. 1984. *Annu Rev Plant Physiol*, 35: 443-478.
- Appleby** CA; Tjepkema JD & Trinick MJ. 1983. *Science*, 220: 951-953.
- Arambarri**, A.M. 1997. *Loteae.. In: Flora fanerogámica Argentina*. Págs.3-7 Proflora CONICET. Fasc. 37, Córdoba, Argentina.
- Atkins** CA & Smith, P. 2000. In *Procaryotic Nitrogen Fixation*, (edited by Wymondham) Horizon Scientific Press.
- Ball** K & Preiss J. 1992. *J. Protein Chem*, 11, 231-238.
- Ballicora** MA, Iglesias AA & Preiss J. 2003. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 213-225.
- Ballicora** MA; Sesma JI; Iglesias AA & Preiss J. 2002. *Biochemistry*, 41: 9431-9437.
- Basset** B; Goodman RN & Novacky A. 1977. *Can J Microbiol*, 23: 573-582.
- Batley** M, Redmond JW, Djordjevic SP and Rolfe BG. 1987. *Biochim Biophys Acta*, 901 : 119-126
- Battisti** L; Lara JC & Leigh JA. 1992. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 5625-5629.
- Benson** DR and Silvester WB. 1993. *Microbiol Rev*, 57: 293-319.
- Bhagwat** AA & Keister DL. 1995 . *Mol Plant Microbe Interact*, 8: 366-370
- Bhagwat** AA; Gross KC; Tully RE and Keister DL. 1996. *J Bacteriol*; 178: 4635-4642.
- Bhagwat** AA; Mithöfer A; Pfeffer PE; Kraus C; Spickers N; Hotchkiss A; Ebel J & Keister DL. 1999. *Plant Physiol*, 119: 1057-1064.
- Bhuvaneshwari** TV; Bhagwat AA & Bauer WD. 1981. *Plant Physiol*, 68: 1144-1149.
- Bohin** JP. 2000. *FEMS Microbiol Lett*, 186: 11-19.
- Bourne** EJ, Huston DH & Weigel H. 1961. *J Chem Soc*, 1: 35-38.
- Bradford** MM. 1976. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Breedveld** MW & Miller KJ. 1994. *Microbiol Rev*, 58: 145-161.
- Brewin** NJ & Kardailsky IV. 1997. *Trends Plant Sci*, 2: 92-98.
- Brewin** NJ. 1991. *Annu Rev Cell Biol*, 7: 191-226.

- Briones** G, Iñón de Iannino N, Steinberg M & Ugalde R. 1997. *Microbiology*, 143: 1115-1120.
- Brooks** SPJ. 1992. *Biotechniques*, 13: 906-911.
- Burkart**, A. 1952. *Loteas.. In: Las leguminosas Argentinas*. Págs. 280-283 Ed. 2, Acme, Buenos Aires, Argentina.
- Burkart**, N.S. Troncoso de y Bacigalupo N.M. 1987. *Leguminosas*. In: *Flora ilustrada de Entre Ríos* (Argentina). Dicotiledóneas-Arquiclamídeas, A: Salicales a Rosales (incluso Leguminosas). Págs. 576-580 Colección Científica Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 6, Buenos Aires, Argentina.
- Caetano-Anolles** G, Cris-Estes DK and Bauer WD. 1988. In *Nitrogen Fixation Hundred Years After*, (edited by Bothe H; de Bruijn FJ and Newton WE) Stuttgart, New York, Fischer.
- Campbell** GRO; Reuhs BL & Walker GC. 2002. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3938-3943.
- Cangelosi** GA; Lung L; Puvaneserajah V; Stacey G; Ozga DA; Leigh JA & Nester EW. 1987. *J Bacteriol*, 169: 2086-2091.
- Carlson** CA & Preiss J. 1982. *Biochemistry*, 21: 1929-1934.
- Charng** YY, Iglesias AA & Preiss J. 1994. *J Biol Chem*, 269: 24107-24113.
- Charng** YY, Sheng J & Preiss J. 1995. *Arch Biochem Biophys*, 318: 476-480.
- Choudhary** M, Mackenzie C, Mouncey NJ & Kaplan S. 1999. *Nucleic Acids Res*, 27: 61-62.
- Clare** BG. 1990. *Sci Prog*, 74: 1-13
- Cohen** JL & Miller KL. 1991. *J Bacteriol*, 173: 4271-4276.
- Cook** D; Dreyer D; Bonnet D; Howell M; Nony E & VandenBosch K. 1995. *Plant Cell*, 7: 43-55.
- Corcoran** MR, Geissman TA & Phinney BO. 1972. *Plant Physiol*. 49: 323-330.
- Curtis** H & Barnes N. 1989. *Biology*, (5th edition) Worth Publishers, Inc., New York.
- de Bruijn** FJ, Rademaker J L W, Shneider M, Rossbach U, Louws F J. 1996. In: *Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*, edited by Stacey G, Mullin B, Gresshoff PM, p. 497-502. St. Paul, M.N: APS Press.
- Dedonder** R & Hassid WZ. 1964. *Biochim Biophys Acta.*, 90: 239-248.
- Deng** Z, Wang X & Kemp RG. 2000. *Arch Biochem Biophys*, 380:56-62.
- Dische**, Z. 1962. *Methods Carbohydr Chem*, 1: 478-492.
- Djordjevic** SA; Chen H; Batley M; Redmond JW & Rolfe BG. 1987. *J Bacteriol*, 169: 53-60.
- Douglas** CJ, Staneloni RJ; Rubin RA & Nester EW. 1985. *J Bacteriol*, 161: 850-860.
- Doyle** JJ. 1994. *Annu Rev Ecol Syst*, 25: 325-349.
- Dreyfus** B; García JL & Gillis M. 1988. *Int J Syst Bacteriol*, 38: 89-98.
- Dunlap** J; Minami E; Bhagwat AA; Keister DL & Stacey G. 1996. *Mol Plant Microbe Interact*, 9: 546-555.
- Dunn**, MF. 1998. *FEMS Microbiol Rev*, 22: 105-123
- Dylan** T; Ielpi L; Stanfield S; Kashyap L; Douglas C; Yanofsky M; Nester E; Helinski DR & Ditta G. 1986. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4403-4407.
- Ebel** J & Mithöfer A. 1998. *Planta*, 206: 335-348.
- Estabrook** EM & Sengupta-Gopalan C. 1991. *Plant Cell*, 3: 299-308.
- Evans** P; Gallesi D; Mathieu C; Hernandez M; de Felipe M; Halliwell B; & Puppo A. 1999. *Planta*, 208: 73-79.
- Fairey** & Smith. 1999. In *Trefoil: The Science and Tecnology of Lotus*. 1999. (edited by Beuselinck PR) American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc, Madison Wisconsin, USA..
- Finan** TM; Mcwhinnie E; Driscoll B & Watson RJ. 1991. *Mol Plant Microbe Interact*, 4: 386-392.

- Foster AB.** 1957. *Adv Carbohydr Chem*, 12: 81-115.
- Fulchieri MM, Estrella MJ & Iglesias AA.** 2001. *Anton van Leeuw*, 79: 119-125.
- Furukawa K, Tagaya M, Tanizawa K & Fukui T.** 1994. *J Biol Chem*, 269: 868-871.
- Furukawa K, Tagaya M, Tanizawa K & Fukui T.** 1993. *J Biol Chem*, 268: 23837-23842.
- Gabius HJ.** 2000. *Naturwissenschaften*, 87: 108-121.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC & Batut J.** 2001. *Science*, 293: 668-672.
- Gamas P; De Billy F & Truchet G.** 1998. *Mol Plant Microbe Interact*, 11: 393-403.
- Gardioli A & Preiss J.** 1990. *Arch Biochem Biophys*, 280: 175-80.
- Geiger O; Weissborn AC & Kennedy EP.** 1991. *J Bacteriol*, 173: 3021-3024.
- Geremia R; Cavaignac S; Zorreguieta A; Toro N; Olivares J & Ugalde R.** 1987. *J Bacteriol*, 169: 880-884.
- Ghosh P, Meyer C, Remy E, Peterson D & Preiss J.** 1992. *Arch Biochem Biophys*, 296: 122-128.
- Goldsterin JL & Swain T.** 1963. *Phytochemistry*, 2: 371-383.
- Gomez-Casati DF, Igarashi RY, Berger CN, Brandt ME, Iglesias AA & Meyer CR.** 2001. *Biochemistry*, 40: 10169-10178.
- Gresshoff PM; Roth LE; Stacey G & Newton WE.** 1990. *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. New York, Chapman and Hall.
- Grifoni A, Bazzicalupo M, Di Serio C, Francelli S & Fani R.** 1995. *FEMS Microbiol Lett*, 127: 85-91.
- Gualtieri G & Bisseling T.** 2000. *Plant Mol Biol*, 42: 181-194.
- Handley WRC.** 1961. *Plant Soil*, 15: 37-73.
- Harley JL & Smith SE.** 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Haslam E.** 1975. In *The Flavonoids*. (Edited by Harborne JB, Mabry T & Mabry H). London. Chapman & Hall.
- Haugen TH & Preiss J.** 1979. *J Biol Chem*, 254: 127-36
- Henis Y, Tagari H & Volcani R.** 1964. *Appl Microbiol*, 12: 204-209.
- Hodge A; Robinson D & Fitter A.** 2000. *Trends Plant Sci*, 7: 304-308.
- Holme T & Palmstierna H.** 1956. *Acta Chem Scand*, 10: 578-586.
- Hotter GS & Scott DB.** 1991. *J Bacteriol*, 173: 851-859.
- Hunt S & Layzell DB.** 1993. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44: 483-511.
- Ielpi L; Dylan T; Ditta GS; Helinski DR & Stanfield SW.** 1990. *J Biol Chem*, 265: 2843-2851.
- Igarashi RY & Meyer CR.** 2000. *Arch Biochem Biophys*, 376: 47-58.
- Iglesias A.A., Preiss J.** 1992. *Biochem. Educ*, 20: 196-203.
- Iglesias AA; Kakefuda G & Preiss J.** 1992. *J Protein Chem*, 11: 119-128.
- Iñón de Iannino N & Ugalde RA.** 1989. *J Bacteriol*, 171: 2842-2849.
- Iñón de Iannino, N & Ugalde, RA.** 1993. *Arch Microbiol*, 159: 30-38.
- Iñón de Iannino N, Briones G, Kreiman G & Ugalde R.** 1996. *Cel Mol Biol*, 42 : 617-629.
- Irisarri P, Milnitsky F, Monza J and Bedmar EJ.** 1996. *Plant Soil*, 180: 39-47.
- Jackson FA & Dawes EA.** 1976. *J Gen Microbiol*, 97: 303-312.
- Jackson LE; Schimel JP & Firestone MK.** 1989. *Soil Biol Biochem*, 21: 409-415.
- Jarvis BDW, van Berkum P, Chen WX., Nour SM, Fernández MP, Cleyet-Marel JC & Gillis M.** 1997. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47: 895-898

- Jarvis** BDW; Pankhurst CE & Patel JJ. 1982. *Int J Syst Bacteriol*, 32: 378-380.
- Jeanes** A, Wise CS & Dimler RJ. 1951. *Anal Chem*, 23: 415-420.
- Jingguo** W & Bakken LR. 1997. *Soil Biol Biochem*, 29:163-170.
- Jones** WT & Mangan JL. 1977. *J Sci Food Agric*, 28: 126-136.
- Jones** WT, Macdonald PE, Jones SD & Pankhurst CE. 1987. *J Gen Microbiol*, 133: 2617-2629.
- Jordan** DC. 1982. *Int J Syst Bacteriol*, 32: 136-139.
- Jordan** DC. 1984. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* vol 1. (edited by Krieg NR & JG Holt) Baltimore & London, Williams & Wilkins.
- Kahan** ML; McDermott TR & Udvardy MK. 1998. In the *Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, Kluwer Acad.
- Kaneko** T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K., Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M & Tabata S. 2002 a. *DNA Res*, 9: 189-197.
- Kaneko** T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K., Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M & Tabata S. 2002 b. *DNA Res*, 9: 225-256.
- Kannenberg** EL; Reuhs BL; Forsberg LS & Carlson RW. 1998. In :*The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht: Kluwer Acad.
- Kefell** VI & Kutacek M. 1977. In *Plant Growth Regulation*. (edited by Pilet PE). Berlin, Springer.
- Kennedy** EP, Rumley MK, Schulman H & van Golde LMG. 1976. *J Biol Chem*, 251: 4208-4213
- Keyser** HH, Bohlool BB & Weber DF. 1982. *Science*, 215: 1631-1632.
- Kirkbride** JH Jr. 1999. In *Trefoil: The Science and Tecnology of Lotus*. (edited by Beuselinck PR & Roberts CA). American Society of Agronomy, Inc. CropScience Society of America, Inc, Madison, Wisconsin .
- Koizumi** K, Kubota Y; Tanimoto T & Okada Y. 1988. *J Chromatogr*, 45: 303-310.
- Laguerre** G, Allard M R, Revoy F & Amarger N. 1994. *Appl. Environ. Microbiol*, 60: 56-63.
- Langer**, R. H. M. 1990. Pastures plants. In *Pastures: Their ecology and management*. (edited by Langer RHM) Oxford University Press, Auckland, Australia
- Lehninger** A L., Nelson D.L. & Cox M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*, 2nd ed. Worth Publishers, New York.
- Leigh** J; Signer ER & Walker GC. 1985. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 6213-6235.
- León**, R.J.C., C.P. Movia y R.F.J. Valencia. 1975. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Monografía No. 5: 19-46.
- Lepek** V; Navarro de Navarro Y & Ugalde RA. 1990. *Arch .Microbiol*, 155:35-41.
- Lippens** G, Wieruszeski JM, Horvath D, Talaga P & Bohin JP. 1998. *J Am Chem Soc*, 120: 170-177.
- Lepek** VC; D'Antuono A; Tomatis PE; Ugalde JE; Giambiagi S & Ugalde RA 2002. *Mol Plant Microbe Interact*, 15: 368-375.
- Lodwig** E & Poole P. 2003. *Crit Rev Plant Sci.* 22: 37-78.
- Lowry** OH, Rosbrough NJ, Farr AL & Randall RJ. 1951. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Madigan** MT; Martinko JM & Parker J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Englewood Cliffs, NJ Prentice-Hall.
- Madsen** NB. 1963. *Can J Biochem Physiol*, 41: 561-571.
- Manen** JF; Simon P; Van Slooten JC; Osteras M; Frutiger S & Hugs G. 1991. *Plant Cell*, 3: 259-270.

- Marroquí S**; Zorreguieta A; Santamaria C; Temprano F; Soberón M; Megias M & Downie JA. 2001. *J Bacteriol*, 183: 854-864.
- Matamorros M**; Baird L; Escuredo P; Dalton D; Minchin F; Iturbe-Ormaetxe I; Rubio M; Moran J; Gordon A & Becana M. 1999. *Plant Physiol*, 121: 97-111.
- Mathews A**; Carroll BJ & Gresshoff PM. 1989. *Protoplasma*, 150: 40-47.
- Matthysse AG**, 1983. *J Bacteriol*, 154: 906-915
- Matthysse AG**. 1986. *Crit Rev Microbiol*, 13: 281-307
- Maxwell, CA & Phillips, DA**. 1990. *Plant Physiol*, 93: 1552-1558.
- McKay I**; Glenn A & Dilworth MJ. 1985. *J General Microb*, 131: 2067-2073.
- Meyer C R**; Borra M; Igarashi R, Lin YS & Springsteel M. 1999. *Arch Biochem Biophys*, 302: 64-71.
- Meyer CR**, Bork JA, Nadler S, Yirsa J & Preiss J. 1998. *Arch Biochem Biophys*, 353: 152-9.
- Meyer CR**; Borra M; Igarashi R; Lin YS & Springsteel M. 1999. *Arch Biochem Biophys*, 372: 179-188.
- Miller KJ**; Gore RS; Jonson R; Benesi AJ & Reinhold VN. 1990. *J Bacteriol*. 172: 136-142.
- Miñon DP**, Sevilla GH, Montes L, y Fernández O. 1990. Boletín Técnico N° 98. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina
- Mithöfer A**. 2002. *Trends Plant Sci*, 7: 440-444
- Mithöfer A**. 1999. *Planta*, 207: 566-574
- Mithöfer A**; Bhagwat AA; Feger M & Ebel J. 1996. *Planta*, 199: 270-275.
- Mizuguchi H**, Cook PF, Hasemann CA & Uyeda K. 1997. *Biochemistry*, 36: 8775-8784.
- Monod J**, Changeux JP & Jacob F. 1963. *J Mol Biol*, 6: 306-329.
- Montes, L**. 1982. Big trefoil naturalized in Southwest of Argentina. *Lotus Newslett*, 13: 22-23.
- Montes, L**. 1988. *Lotus tenuis*. Revista Argentina de Producción Animal 8:367-376
- Monza J**, Fabiano E & Arias A. 1992. *Soil Biol Biochem*, 24: 241-247.
- Moore LW & Cooksey DA** 1981. *Biology of the Rhizobiaceae* (edited by Giles, KL & Ather, AG) Academic press, New York.
- Morell MK**, Bloom M, Knowles V & Preiss J. 1987. *Plant Physiol*, 85: 182-187.
- Morris VJ**; Brownsey GJ; Chilvers GR; Harris JE; Gunning AP & Stevens BHJ. 1991. *Food Hydrocoll*, 5: 185-188.
- Mudler EG**; Deinema MH; Van Ween WL & Zevenhuizen LPTM. 1962. *Rec Trav Chim Pays-Bas*, 81: 797-809.
- Müller J**; Boller T & Wiemken A. 2001. *J Exp Bot*, 52: 949-947.
- Müller J**; Xie ZP; Stachelin C; Boller T & Wiemken A. 1994. *J Plant Physiol*, 143: 153-160
- Mylona P**; Pawlowski K & Bisseling T. 1995. *Plant Cell*, 7: 869-885.
- Niehaus K**; Kapp D & Pühler A. 1993. *Planta*, 190: 415-425.
- Nikaido H & Vaara M**. 1985. *Microbiol Rev*, 49: 1-32
- O'Connell KP & Handselman J**. 1989. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2: 11-16.
- Osborn MJ & Munson R**. 1984. *Methods Enzymol*, 31 A: 642-653
- Osteras M**; Finan TM & Stanley J. 1991. *Mol Gen Genet*, 230: 257-269.
- Paleschi A & Crescenzi V**. 1985. *Gazz Chim Ital*, 115: 243-245.
- Pankhurst CE & Jones WT**. 1979. *J Exp Bot*, 119: 1095-1107.
- Pankhurst CE**, Hopcroft DH and Jones WT. 1987. *Can J Bot*, 65: 2676-2685.
- Pankhurst CE**. 1977. *Can J Microbiol*, 23: 1026-1033.
- Parniske M**. 2000. *Curr Opinion Plant Biol*, 3: 320-328.
- Parsons TF & Preiss J**. 1978 a. *J Biol Chem*, 253: 6197-6202.
- Parsons TF & Preiss J**. 1978 b. *J Biol Chem*, 253: 7638-7645.
- Pawlowski K & Bisseling T**. 1996. *Plant Cell*, 8: 1899-1913.

- Perotto S**, Brewin NJ & Kennenberg EL 1994. *Mol Plant-Microbe Interact*, 7: 99-112.
- Pfeiffer N**; Torres C & Wagner F. 1983. *Plant Physiol*, 71: 797-802.
- Pfeffer P E**, Osman S F, Hotchkiss A, Bhagwat A A, Keister D L & Valentine K M 1996. *Carbohydr. Res*, 296: 23-37
- Poole PS** & Allaway DA. 2000. *Adv Microb Physiol*, 43: 117-163.
- Preiss J** & Romeo T. 1989. In *Advances in Microbial physiology* (edited by Rose AH & Tempest DW) pp183-238, Academic Press, New York.
- Preiss J**. 1991. In *Oxford Surveys of Plant Molecular and cell Biology* (edited by Milfin B) pp 59-114. Oxford University Press, Oxford.
- Preiss J**. 1996. *Biotechnol Annu Rev*, 2: 259-279.
- Preiss, J**. 1989. In *Bacteria in Nature* (edited by Poindexter JS & Leadbetter ER) pp189-258, Plenum, New York.
- Preiss, J**. 1999. In *Biorganic Chemistry: Carbohydrates*, (edited by Hecht S.M) Oxford University Press, Oxford, pp. 489-554
- Preiss, J**. 1984. *Ann Rev Microbiol*, 38: 419-458
- Puvanesarajah V**; Schell FM; Stacey G; Douglas CJ & Nester EW. 1985. *J Bacteriol*, 164: 102-106.
- Raab TK**; Lipson DA & Monson RK. 1996. *Oecologia*, 108: 488-494.
- Reibach PH** & Streeter JG. 1983. *Plant Physiol*, 72: 634-640.
- Rolin DB**; Pfeffer PE; Osman SF; Szwegold BS, Kappler F & Benesi A., 1992. *Biochim Biophys Acta*, 1116: 215-225.
- Romeo T** & Preiss J. 1989. *J Bacteriol*, 171: 2773-2782
- Sambrook J**, Fritsch EF & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Santos R**, Herouart D, Puppo A & Touati D. 2000. *Mol Microbiol*, 38: 750-759.
- Scheres B**; van Engelen F; van der Knaap E; van der Wiel C; van Kammen A & Bisseling T. 1990b. *Plant Cell*, 2: 687-700
- Schoonejans E**; Espert D & Toussaint A. 1987. *J Bacteriol*, 169: 4011-4017.
- Schubert KR**. 1986. *Annu Rev Plant Physiol*, 37: 539-574.
- Sheng J** & Preiss J. 1997. *Biochemistry*, 36: 13077-13084.
- Sheng J**, Charng YY & Preiss J. 1996. *Biochemistry*, 35: 3115-3121.
- Sivak M** & Preiss J. 1998. in *Advances in Food and Nutrition Research* (edited by Taylor SL) pp1-199, Academic Press, San Diego.
- Spaink HP**. 2000. *Annu Rev Microbiol*, 54: 257-288.
- Sprent JI** & Sprent P. 1990. *Nitrogen Fixing Organisms*. Chapman & Hall, London.
- Stam H**; Devries W; Stouthamer AH & Vanverseveld HW. 1986. *FEMS Microbiol Lett*, 35: 215-220.
- Stanfield SW**; Ielpi L; O'Brocta D; Helinski DR & Ditta GS. 1988. *J Bacteriol*, 170: 3523-3530.
- Strange RE**; Dark FA & Ness AG. 1961. *J Gen Microbiol*, 25: 61-76
- Subba-Rao NS**; Mateos PF; Baker D; Pankratz HS; Palma J; Dazzo FB & Sprent JI. 1995. *Planta*, 196: 311-320.
- Swain T**. 1977. *Annu Rev Plant Physiol*, 28: 479-501.
- Takata H**, Takaha T, Okada S, Takagi M, & Imanaka T. 1997. *J Bacteriol*, 179: 4689-4698.
- Thummler F** & Verma DPS. 1987. *J Biol Chem*, 262: 14730-14736.
- Tomos A D** & Northcote D H. 1978. *Biochemistry*. 174: 283-290.
- Trevelyan WF**, Procter DP & Harrison JS. 1950. *Nature* (London), 166: 444-445.
- Trinick MJ**. 1980. *J Appl Bacteriol*, 49: 39-53.
- Tsien HC**; Dreyfus BL & Schmidt EL. 1983. *J Bacteriol*, 156: 888-897.
- Tully RE**; Keister DL & Gross KC. 1990. *Appl Environ Microbiol*. 56: 1518-1522.
- Tung KK** & Nordin JH. 1968. *Biochem. Biophys. Acta*, 158: 154-156

- Udvardi** MK; Ou Yang LJ; Young S & Day DA. 1990. *Mol Plant- Microbe Interac*, 3: 334-340.
- Udvardy** M & Day D. 1997. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 493-523
- Ugalde** JE; Lepek V; Uttaro A; Estrella J; Iglesias A & Ugalde RA. 1998. *J Bacteriol* 180: 6557-6564.
- Uttaro** AD & Ugalde RA. 1994. *Gene*, 150: 117-122.
- Uttaro** AD; Ugalde RA; Preiss J & Iglesias AA. 1998. *Arch Biochem Biophys*, 357: 13-21.
- van Workum** WAT; van Slageren S; van Brussel AAN & Kijne JW. 1998. *Mol Plant Microbe Interact*, 11: 1233-1241.
- Vance** CP. 2000. In: *Prokaryotic Nitrogen Fixation*, (edited by Triplett E) Wymondham. Horizon Scientific press.
- Vasse** J; De Billy F; Camut S & Truchet G. 1990. *J Bacteriol*, 172: 4295-4306.
- Vikman** PA & Vessey J. 1993 a. *J Exp Bot*, 44: 563-569.
- Vikman** PA & Vessey J. 1993 b. *J Exp Bot*, 44: 571-577.
- Vikman** PA & Vessey J. 1993 c. *J Exp Bot*, 44: 579-586.
- Vincent**, JM. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-nodule bacteria, edited by Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Vincent** JL & Brewin NJ. 2000. *Plant Physiol*, 123: 521-530
- Vitousek** PM & Howarth RW. 1991. *Biogeochemistry* 13: 87-115.
- Vitousek** PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler WH, Schlesinger DW & Tilman DJ. 1997. *Ecol. Applications*, 7:737-750.
- Wacek** T & Brill W. 1976. *Crop Science*, 16: 519-522
- Waters** JK; Huges BL; Purcell LC; Gerhardt KO; Mawhinney TP & Emerich DW. 1998. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 12038-12042.
- Wilson** K. 1994. In: Current Protocols In: Molecular Biology, chapter 2, ed by Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Williamson** G; Damani K; Devenney P; Faulds CB; Morris VJ & Stevens BJH. 1992. *J Bacteriol*, 174: 7941-7947.
- Witty** JF; Minchin FR; Skot L & Sheeley JE. 1986. *Plant Cell Biol*, 3: 275-315.
- Wood** SM, Layzell DB, Newcomb W & Pankhurst CE. 1985. *Can J Bot.*, 63: 43-53
- Wu** MX & Preiss J. 1998. *Arch Biochem Biophys*, 358: 182-188.
- Wu** MX & Preiss J. 2001. *Arch Biochem Biophys*, 389: 159-65.
- Xie** ZP; Staehelin C; Wiemken A; Broughton W; Müller J & Boller T. 1999. *J Exp Botany*, 50: 327-333
- Young** JPW. 1996. *Plant Soil*, 186: 45-52.
- Young** JPW & Johnston AWB. 1989. *Trends Ecol Evol*, 4: 331-349.
- Zorreguieta** A & Ugalde RA. 1986. *J Bacteriol*, 167: 947-951.
- Zorreguieta** A; Tolmasky ME & Staneloni RJ. 1985a. *Arch Biochem Biophys*, 238: 368-372.
- Zorreguieta** A; Ugalde RA & Leloir LF. 1985b. *Biochem Biophys Res Común*, 126: 352-357.