



03081
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA 3
DE MEXICO 24

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION
DE NITROGENO

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL
PLASMIDO B DE *Rhizobium etli* CFN42

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A :
ALEJANDRO GARCIA DE LOS SANTOS

CUERNAVACA, MOR.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Brom por apoyar la continuación de mi carrera científica y estimular mis ideas respecto a los plásmidos de *Rhizobium*.

A los Drs. Rafael Palacios y David Romero por su interés en mi superación académica.

A los integrantes del comité tutorial de Maestría y Doctorado por sus valiosas discusiones y a los miembros del jurado por el tiempo dedicado a corregir y mejorar esta tesis:

Dra. Susana Brom, Dr. Guillermo Dávila, Dr. Luis Servín, Dra. Esperanza Martínez, Dr. Rafael Palacios, Dr. Mario Soberón, Dr. Miguel Angel Cevallos y Dra. Laura Camarena.

A todos mis compañeros del Departamento de Genética Molecular del CIFN (Investigadores, Técnicos, Estudiantes, Secretarías y Personal de Intendencia) por su cooperación durante la elaboración de esta tesis. A Alma Córdova por hacernos la vida más amable en la Unidad de Enseñanza.

Mi especial agradecimiento a mi esposa María por su comprensión y apoyo en los momentos críticos de este trabajo, y a mis Padres y Hermanos por sus valiosos estímulos.

A mis amigos del CIFN y del IBT especialmente a Amparo Gutiérrez, Rosy Ocampo, Mario Ramírez, Ismael Hernández y L. Ernesto Fuentes; Claudia Díaz y Miguel Villalobos, Irma Martínez y Victor Bustamante, Chema y Nieves, Rosy y Memo Larios, Mario Rocha y Adriana Garay.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM, bajo la Dirección de la Dra. Susana Brom Klanner, y contó con los apoyos económicos del propio Depto. de Genética Molecular, PADEP y CONACyT (programa de apoyo a Profesores para obtener el Doctorado REF 940032)

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES SOBRE PLASMIDOS BACTERIANOS	2
TRANSFERENCIA DE INFORMACION GENETICA MEDIADA POR PLASMIDOS	3
FUNCIONES CODIFICADAS EN PLASMIDOS Y SU PAPEL EN LA EVOLUCION BACTERIANA	6
ANTECEDENTES	9
PLASMIDOS DE <i>Rhizobium</i>	9
<i>Rhizobium</i> PLASMIDS IN BACTERIA-LEGUME INTERACTIONS (REVISION)	11
FUNCIONES CODIFICADAS EN PLASMIDOS DE <i>Rhizobium etli</i> CFN42	18
DERIVADAS DE <i>Rhizobium etli</i> CFN42 CURADAS DE MULTIPLES PLASMIDOS	21
CARACTERIZACION DE SECUENCIAS AISLADAS DE PLASMIDOS DE <i>Rhizobium etli</i> CFN42	22
ESTRUCTURA DE LA SUPERFICIE CELULAR BACTERIANA	24
POLISACARIDOS PRODUCIDOS POR <i>Rhizobium</i>	25
OBJETIVOS	29
RESULTADOS	
CHARACTERIZATION OF TWO PLASMID-BORNE <i>lps</i>β LOCI OF <i>Rhizobium etli</i> REQUIRED FOR LIPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS AND FOR OPTIMAL INTERACTION WITH PLANTS. (ARTICULO)	30
RESULTADOS ADICIONALES	46

INFORMACION ADICIONAL SOBRE EL ORF1 INCOMPLETO.....	46
OTRAS SBCUENCIAS DEL pCPN42B CONSERVADAS EN EL GENOMA DE	
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843 y <i>R. leguminosarum</i> bv. viciae VF39.....	47
EXPERIMENTOS DE INCOMPATIBILIDAD DE PLASMIDOS.....	49
DISCUSION Y PERSPECTIVAS.....	51
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS.....	58
TABLA 1.....	65
TABLA 2.....	66
FIGURAS 1 a 9.....	67-75

ABSTRACT

Rhizobium etli CFN42 is a Gram-negative soil bacteria able to induce the formation of nitrogen-fixation nodules on roots of common bean and other seven tropical leguminous plants.

The genetic information of this bacteria is distributed among the chromosome and six plasmids. We have previously demonstrated by analysing plasmid-cured derivatives, that in addition to nodulation and nitrogen-fixation genes (*nod*, *nif* and *fix*) located on the symbiotic plasmid pCFN42d (pSym), the genetic *lpsβ* region carried on the pCFN42b plasmid is also essential for bean nodulation.

This *lpsβ* region is required for lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis, the major structural component of Gram-negative bacteria outer membrane.

The pSym is the best characterized part of the genome. Although it has been shown that plasmids other than the pSym may also influence the simbiotic and free-living state, only few sequences from these plasmids have been studied.

In the present work, we report the genetic array and functional features of the *lpsβ* region. The DNA sequence analysis of a 3 595 bp fragment revealed the presence of two ORFs (*lpsβ* 1 and *lpsβ* 2) essential for LPS synthesis.

On the basis of amino acid sequences similarities and the LPS chemical composition data previously reported, we propose that Lpsβ1 may be responsible for the transfer of galactose or galacturonic acid to the core component of LPS. Lpsβ2 could be a dehydratase involved in the synthesis of the 6-deoxy or dideoxy sugars which links the O-antigen to the core oligosaccharide.

DNA sequences homologous to *lpsβ*1 and *lpsβ*2 of *R. etli* CFN42 were consistently found in functionally equivalent plasmids of *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* and bv. *trifolii* strains, but not in other *Rhizobium* and *Agrobacterium* species.

In addition to *lpsβ* 1 and *lpsβ* 2, a large amount of sequences from pCFN42b are conserved in the genome of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 and *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39, such homologous sequences are distributed among different plasmids.

dear Brown

RESUMEN

Rhizobium etli CFN42 es una bacteria Gram negativa habitante del suelo, que tiene la capacidad de formar nódulos en las raíces de frijol y de otras siete especies de leguminosas tropicales. Dentro de los nódulos, las bacterias diferenciadas en bacteroides transforman el nitrógeno atmosférico en amonio y lo transfieren a la planta la cual lo utiliza para su crecimiento.

El genoma de esta bacteria se encuentra constituido por un cromosoma y seis plásmidos.

En un estudio previo en el cual se analizaron las características fenotípicas de cepas derivadas curadas de cada uno de sus plásmidos, demostramos que en *R. etli* CFN42 además de los genes necesarios para nodulación y fijación de nitrógeno (*nod*, *nif* y *fix*) contenidos en el pCFN42d o plásmido simbiótico (pSim), existe otra región genética denominada *lpsβ* localizada en el plásmido pCFN42b, la cual también es indispensable para nodulación de raíces de frijol. La región *lpsβ* es necesaria para la biosíntesis de lipopolisacárido (LPS), un componente estructural de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

Como en muchas otras especies de *Rhizobium*, el pSim constituye el componente mejor caracterizado del genoma de *R. etli*. Aunque se ha demostrado que el resto de los plásmidos afectan las condiciones de vida simbiótica y saprofítica, se han estudiado muy pocas secuencias de otros plásmidos.

En este trabajo, presentamos la caracterización genética de la región *lpsβ*. El análisis de secuencia de 3 395 pb mostró la presencia de dos marcos de lectura abiertos denominados *lpsβ1* y *lpsβ2* indispensables para síntesis de LPS. El análisis de similitud de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Lpsβ1 y Lpsβ2, así como datos bibliográficos de la estructura química del LPS, sugieren que la proteína Lpsβ1 puede ser una enzima que transfiera galactosa o ácido galacturónico a la parte del LPS conocida como "core". La proteína Lpsβ2 podría ser una deshidratasa participando en la síntesis de alguno de los desoxi o didesoxi-azúcares que enlazan el core con el antígeno-O.

Fueron encontradas secuencias homólogas a *lpsβ1* y *lpsβ2* en plásmidos de *R. leguminosarum* bv. trifolii y de *R. leguminosarum* bv. viciae, pero no en el genoma de otras especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium*.

Además de los genes *lpsβ1* y *lpsβ2*, un gran número de secuencias del pCFN42b de *R. etli* se encuentran conservadas en el genoma de *R. leguminosarum* bv. trifolii ANUB43 y *R. leguminosarum* bv. viciae VF39 aunque no siempre localizadas en el mismo replicón.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES SOBRE PLÁSMIDOS BACTERIANOS.

El material genético de las bacterias se encuentra constituido por moléculas de ADN organizadas en cromosomas y plásmidos (Campbell 1993, Levin 1993). El cromosoma bacteriano es una molécula de ADN circular o lineal cuyo tamaño puede variar entre 0.6 a 10 Mb. En la mayoría de las bacterias se ha descrito la presencia de un solo cromosoma, sin embargo en *Rhodobacter sphaeroides* (Suwanto y Kaplan 1989) y *Brucella melitensis* (Michaux *et al* 1993) se han identificado dos cromosomas circulares. En el cromosoma se encuentran localizados genes esenciales para el funcionamiento celular, como por ejemplo, aquellos que codifican para las proteínas y rARNs que constituyen la estructura del ribosoma. Asimismo, en el cromosoma se encuentran codificadas la mayoría de las enzimas necesarias para el funcionamiento de las principales vías metabólicas de la bacteria.

Como se mencionó anteriormente, las bacterias contienen elementos extra-cromosomales denominados plásmidos, los cuales son generalmente de menor tamaño que el cromosoma. Plásmidos y cromosoma se replican de manera independiente dentro de la célula bacteriana, pero sincronizados con el crecimiento y división celular, lo cual permite que copias de ambos replicones puedan ser heredadas en las siguientes generaciones.

Casi todos los plásmidos descritos son moléculas circulares de ADN de tamaño variable. Se han aislado pequeños plásmidos de 2.6 kb, hasta megaplásmidos de 1600 kb (Antoine y Locht 1992, Charles y Finan 1991). Sin embargo plásmidos lineales con un rango de tamaño entre 9 kb y 600 kb se han identificado en diferentes especies de *Streptomyces* (Hinnebusch y Tilly 1993). También se han encontrado en *Thiobacillus versutus* y en *Nocardia opaca* actualmente llamado *Rhodococcus sp.* (Hinnebusch y Tilly 1993).

La presencia de plásmidos lineales y circulares dentro de una misma bacteria, se ha descrito en algunas especies como en *Rhodococcus fascians*, patógeno de una gran variedad de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, y en bacterias del género *Borrelia*, un parásito de humanos. En *Rhodococcus fascians* el plásmido lineal tiene un tamaño de 200 kb mientras el circular es de 138 kb (Crespi *et al* 1992). Entre los diferentes miembros del género *Borrelia*, el tamaño de los plásmidos lineales puede variar entre 16 kb y 200 kb, mientras que los plásmidos circulares no son mayores a 30 kb (Hianebusch y Barbour 1992).

El número de plásmidos diferentes por célula es también una característica sumamente variable. Algunas especies llevan uno o dos plásmidos, mientras que en algunas otras, como en el caso de *Bacillus thuringiensis* cepa 1713 se ha observado la presencia de diecisiete plásmidos (Slater *et al* 1988).

Adicionalmente, el número de copias de un mismo plásmido dentro de una bacteria puede variar desde una ó dos hasta cincuenta copias. Existe una correlación entre el tamaño de los plásmidos y su número: a mayor tamaño menor número de copias (Slater *et al* 1988).

TRANSFERENCIA DE INFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR PLÁSMIDOS.

A lo largo de la evolución, los plásmidos probablemente han sido de gran importancia por su capacidad para dispersar e intercambiar información genética dentro de las poblaciones microbianas. De los tres procesos de transferencia de material genético que operan en bacterias (transducción, transformación y conjugación), el mejor estudiado en poblaciones naturales es la conjugación.

Los plásmidos que contienen toda la información genética necesaria para su propia transferencia mediante conjugación, reciben el nombre de plásmidos conjugativos o auto-transferibles. En

ellos existe una región de alrededor de 33 kb en la cual se han identificado cerca de treinta genes *tra* necesarios para que el proceso de auto-transferencia de ADN se lleve a cabo. Al menos cuatro de estos genes están involucrados en la formación de pili (Porter 1991).

Existe otro tipo de plásmidos denominados movilizables los cuales, a diferencia de los conjugativos, carecen de los genes *tra* responsables para la producción de pili y otras funciones de conjugación. A pesar de esta deficiencia, la transferencia de estos plásmidos es eficientemente complementada por plásmidos conjugativos (Porter 1991).

También existen plásmidos que carecen de las funciones de transferencia y movilización los cuales son conocidos como plásmidos no movilizables. Dichos plásmidos pueden llegar a ser transferidos por co-integración con un plásmido movilizable o con un plásmido auto-transferible (Porter 1991).

El material genético transferido de una bacteria a otra, no solo proviene de los propios plásmidos, también el ADN cromosomal puede transferirse mediante plásmidos. Este proceso se describió inicialmente para el factor F de *E. coli* y posteriormente se encontró en algunas especies de *Streptomyces* y *Pseudomonas* (Porter 1991).

Para que la transferencia e intercambio de genes mediada por plásmidos sea exitosa, se requiere que dichos plásmidos sean mantenidos establemente dentro de las bacterias hospederas y coexistan con los plásmidos presentes dentro de estas bacterias. Si dos o más plásmidos, son mantenidos de manera estable dentro de la misma bacteria durante múltiples generaciones, se dice que son compatibles. Por otro lado, si no pueden coexistir se dice que son plásmidos incompatibles. La incompatibilidad es una propiedad que se ha utilizado para clasificar a los plásmidos. Los plásmidos compatibles pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad, y los plásmidos incompatibles pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad. Se han descrito 25 grupos de incompatibilidad en *E. coli*, 7 en *Staphylococcus aureus* y 13 en *Pseudomonas* (Couturier *et al.* 1988, Boronin 1992).

Los elementos genéticos que controlan el número de copias o la partición (segregación), muestran características comunes en plásmidos que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (Couturier *et al.* 1988).

Uno de los mecanismos de incompatibilidad entre plásmidos se presenta cuando el represor de replicación (proteína o ARN antisentido) de un plásmido, ejerce un efecto inhibitorio sobre la replicación de otro plásmido. La disminución en el número de copias de este último ocasionará al paso de múltiples generaciones la formación de líneas celulares conteniendo uno u otro plásmido (Novick 1987). Por otro lado, el mecanismo de incompatibilidad por partición, se lleva a cabo cuando existe una competencia entre dos plásmidos por el mismo sitio de unión a proteínas de membrana las cuales participan en la segregación. Esta competencia ocasionará una distribución desigual de ambos plásmidos en la población (Austin y Nordstrom 1990).

Algunos plásmidos son capaces de transferirse y replicarse únicamente dentro de un número limitado de especies bacterianas relacionadas. En contraste, otros pueden moverse y replicarse en un amplio rango de bacterias Gram-negativas, como es el caso de los plásmidos que pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncP, IncQ e IncW. Estos plásmidos cuentan con algunas funciones que incrementan la probabilidad de un establecimiento exitoso dentro del nuevo hospedero. Como ejemplo podemos mencionar las proteínas Sog (DNA primasa), las cuales se sintetizan en la bacteria donadora y se transfieren junto con el plásmido, a la bacteria receptora. Estas proteínas aseguran el inicio de la síntesis de la cadena complementaria, independientemente de las primasas de la bacteria receptora. (Wilkins *et al.* 1991). Otro tipo de estrategia utilizada por los plásmidos de amplio rango de hospedero, es la síntesis de proteínas de antirestricción (Ard) las cuales evitan que el plásmido transferido sea digerido por las enzimas de restricción presentes en la célula hospedera. Debido al gran número de residuos ácidos presentes en las proteínas Ard, se ha propuesto que pueden funcionar como polianiones inactivando el sitio de unión al ADN de las enzimas de restricción (Delver *et al.* 1991).

La transferencia horizontal de material genético por conjugación no es un proceso que ocurra únicamente entre bacterias; la transferencia de plásmidos conjugativos de *E. coli* a *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito (Amábile-Cuevas and Chicurel 1992), pero el caso más sorprendente de transferencia de información genética es el que se lleva a cabo entre dos grupos taxonómicos extremadamente distantes: bacterias Gram-negativas del género *Agrobacterium* y plantas dicotiledóneas. La transferencia del T-ADN desde el plásmido Ti de *Agrobacterium* hasta el interior de la célula vegetal, se lleva a cabo por medio de una serie de eventos moleculares similares a los que ocurren durante la conjugación entre dos bacterias (Zambryski *et al.* 1989).

FUNCIONES CODIFICADAS EN PLÁSMIDOS Y SU PAPEL EN LA EVOLUCIÓN BACTERIANA.

El estudio de las funciones codificadas en plásmidos, se inició algunos años después de la segunda guerra mundial. Debido al uso masivo de antibióticos durante ese período, comenzaron a aparecer cepas resistentes a múltiples antibióticos. El análisis de las cepas multiresistentes permitió identificar a los plásmidos como los agentes causales de la rápida dispersión de la resistencia a antibióticos. De esta manera, el interés en los plásmidos se expandió rápidamente hasta llegar a formar parte fundamental de la genética moderna.

En años recientes, una buena parte del análisis de funciones codificadas en plásmidos se ha concentrado en aquellos genes con aplicación biotecnológica potencial como los de *Streptomyces* para producción de antibióticos, los de *B. thuringiensis* para producción de toxinas para el control de insectos, los de *Pseudomonas* para la degradación de contaminantes químicos, los de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* para la transformación genética de plantas y los de *Rhizobium* para la fijación biológica de nitrógeno (Chater y Hopwood 1989). Sin

embargo, en la mayoría de las bacterias los plásmidos son considerados crípticos, es decir se desconoce su función.

Más allá del valor biotecnológico que los plásmidos tienen para el hombre, estos han enriquecido en gran medida la diversidad genética de las comunidades bacterianas, participando tanto en la adaptación de los microorganismos a su medio ambiente como en la colonización de nuevos nichos ecológicos. El más claro ejemplo al respecto está representado por dos bacterias miembros de la familia Rhizobiaceae : *Agrobacterium* y *Rhizobium* .

Parte de la información genética contenida en el plásmido Ti (pTi) de *A. tumefaciens* (el T-ADN) le ha permitido a esta bacteria pasar del suelo al espacio intercelular de un gran número de plantas (643 especies diferentes) y nutrirse a expensas de ellas. Como se mencionó anteriormente, una vez que *Agrobacterium* infecta una planta, el T-ADN se transfiere al cromosoma vegetal. A partir de esta información genética se inicia una descontrolada proliferación de células vegetales alrededor del sitio de infección. Las células transformadas comienzan a producir opinas, compuestos ricos en carbono y nitrógeno los cuales son utilizados por *Agrobacterium* mediante enzimas codificadas en el mismo pTi. Además, las opinas actúan como inductores para la transferencia del pTi, lo cual trae como resultado un mayor número de células vegetales transformadas (Yanagita 1990).

El mecanismo por el cual *Rhizobium* pasa del suelo al interior de las células vegetales de numerosas plantas leguminosas pareciera ser aún más elaborado. Compuestos flavonoides normalmente exudados por las raíces de plantas inducen la expresión de genes de nodulación, localizados en la mayoría de las especies de *Rhizobium*, en el plásmido simbiótico (pSim). Los genes *nod*, *nol* y *noe* participan en la síntesis de un lipo-oligosacárido extracelular, conocido como factor de nodulación (Dénarié y Cullimore 1993). Esta molécula induce la deformación de pelos radiculares, y a nivel del cortex, promueve una actividad meristemática, que culmina con la formación de un nuevo órgano llamado nódulo. En el interior del nódulo, las bacterias sufren

una serie de cambios morfológicos y bioquímicos para llegar al estado de bacteroide. Al mismo tiempo, los genes que codifican para la nitrogenasa se activan, dando inicio el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno. Durante la simbiosis, *Rhizobium* aporta nitrógeno en forma de amonio a la planta, y la planta suministra compuestos de carbono a la bacteria. Aunque el pSim es la parte del genoma de *Rhizobium* mejor caracterizada, existe interés por conocer que función tienen el resto de los plásmidos de estas bacterias, tanto en su fase de vida libre en el suelo, como durante su interacción con plantas.

ANTECEDENTES

PLÁSMIDOS DE *Rhizobium*.

El genoma de *Rhizobium*, esta constituido por un cromosoma y varios plásmidos. El tamaño y número de plásmidos es muy variable aún dentro de miembros de la misma especie. Su tamaño puede variar en un rango que va de 150 kb hasta 1500 kb y el número de plásmidos por célula se ha estimado entre 1 y 10. El tamaño de algunos de los plásmidos de *Rhizobium* es mayor al tamaño promedio de otros plásmidos de bacterias de suelo, los cuales normalmente no rebasan las 350 kb.

La información genética que permite a *Rhizobium* inducir la formación de nódulos y fijar nitrógeno se encuentra casi totalmente localizada, en la mayoría de las especies, en un plásmido denominado plásmido simbiótico (pSim). El pSim constituye la parte del genoma mejor caracterizada en *Rhizobium*; de hecho los mapas físicos y genéticos de algunos plásmidos simbióticos han sido publicados (Charles y Finan 1990; Girard *et al.* 1991; Prakash *et al.* 1981) y recientemente se reportó la secuencia de ADN del plásmido completo pNGR234a de *Rhizobium* sp NGR234, en el cual se localizan la mayoría de los genes simbióticos de esta cepa (Freiberg *et al.* 1997).

Por otro lado, mutaciones localizadas fuera del pSim, así como el análisis de cepas curadas de diferentes plásmidos han permitido conocer que genes localizados en otros replicones también afectan el proceso simbiótico (Brom *et al.* 1992; Hynes y McGregor 1990).

Adicionalmente, los plásmidos simbióticos y no simbióticos son mantenidos establemente durante generaciones sucesivas en cultivos de laboratorio, lo cual sugiere un fuerte compromiso de estos replicones con las funciones celulares de estas bacterias (Mercado-Blanco y Olivares 1993; Weaver *et al.* 1990). De hecho, algunos experimentos realizados en nuestro laboratorio

indican que una cepa de *R. etli* CFN42 curada de casi todos sus plásmidos (excepto por un plásmido de 270 kb producto de una delección) muestra una drástica reducción en su capacidad de crecimiento y sobrevivencia en condiciones de laboratorio (Brom, datos no publicados). Asimismo, una cepa derivada de *R. trifolii* W14-2, curada de todos sus plásmidos, no logra sobrevivir en la rizosfera de plantas de trébol (Moënne-Loccoz y Weaver 1995).

Adicionalmente, el hecho de que en las cepas *R. etli* CFN42 (Brom *et al.* 1992) y *R. meliloti* SU47 (Charles y Finan 1991), uno de sus plásmidos no ha podido ser completamente eliminado, sugiere que la parte del plásmido que se mantiene, pudiera contener información genética indispensable para la vida de la bacteria.

Datos que resaltan la participación de otros plásmidos tanto en simbiosis como en vida libre están comenzando a aparecer cada vez con mayor frecuencia. Incluso es bastante común observar en la literatura donde se describe un nuevo gen de *Rhizobium*, hibridaciones tipo Southern para determinar si está en plásmido o en cromosoma.

Con la finalidad de tener una visión general del papel que juegan los plásmidos diferentes del pSim en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, a continuación presentamos una revisión en la cual hemos recopilado la información más relevante respecto a las funciones codificadas en plásmidos no-simbióticos. Esta revisión, junto con los datos publicados casi simultáneamente por Mercado-Blanco y Toro, permiten tener una clara visión del estado actual de esta área de investigación, así como de sus perspectivas.

Rhizobium plasmids in bacteria-legume interactions

A. Garcia-de los Santos, S. Brom and D. Romero*

The functional analysis of plasmids in *Rhizobium* strains has concentrated mainly on the symbiotic plasmid (pSym). However, genetic information relevant to both symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium* life cycles, located on either 'cryptic' replicons, has also been reported. Information is reviewed which concerns functional features encoded in plasmids other than the pSym: biosynthesis of cell surface polysaccharides, metabolic processes, the utilization of plant residues, enzymatic compounds and diverse sugars, and features involved in symbiotic performance. In addition, factors which affect plasmid evolution through their influence on structural features of the plasmids, such as conjugative transfer and genomic rearrangements, is discussed. Based on the overall data, we propose that together the plasmids and the chromosome constitute a fully integrated genomic complex, entailing structural features as well as saprophytic and cellular functions.

Keywords: free-living metabolism, genomic organization, plasmid, *Rhizobium*, symbiosis.

An Overview of the Components in the *Rhizobium* Genome

Rhizobium spp. are well known among Gram-negative bacteria because of the huge amount of genetic information carried in an extrachromosomal pool. Large circular plasmids ranging in size from 150 to 1500 kb, are common components of the *Rhizobium* genome. In fact, the megaplasmids of *R. meliloti* (1200 to 1500 kb) are among the largest known bacterial plasmids (Campbell 1993). The number of different plasmids present in *Rhizobium* is very variable both intra- and inter-species, ranging from two to ten. Calculations based on assumed sizes for the chromosome, indicate that these plasmids may represent between 25 and 50% of the total genome (Martinez *et al.* 1990). In most *Rhizobium* species many genes involved in nodulation and nitrogen fixation are encoded on a single large plasmid, the symbiotic plasmid or pSym.

Plasmids have long been considered (by definition) as nonessential components of bacterial genomes, not required for the survival and replication of individual bacteria. Their recognized function is to confer additional, albeit dispensable

traits that enhance the ability of bacterial populations to colonize and compete in natural communities. The pSyms conform to this definition by conferring the ability to colonize a particular niche, the legume root nodule. The basic and applied implications of nodulation and N₂ fixation have motivated intense research into the genetic basis of these phenomena which has been concentrated almost invariably on the pSymb (see Fischer 1994 and Schultz *et al.* 1994 for recent reviews).

pSymb however, represent a comparatively small part of the extrachromosomal pool. The remaining plasmids have been considered until recently, as 'cryptic' plasmids. Are they truly cryptic? Is it possible for a bacterial cell to harbor such a sizeable amount of DNA without any detrimental effect? Are these plasmids dispensable components or do they carry essential functions? What role do these plasmids play in bacteria-legume interactions? In this article, we review the relevant information pertaining to these issues, which has appeared during the past few years.

Genetic Strategies Employed in Plasmid Analysis

In what way do these plasmid structures affect the cellular functions? Different experimental approaches have sought to answer this question. A widely used technique has been

The authors are with the Depto. de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, A. Postal 555-A, Cuernavaca, Morelos, México, Tel: (75) 17 55 51. *Corresponding author.

employed for the direct visualization of large plasmids (Lichtenfeld 1978). A gross analysis of plasmid-encoded functions involves the isolation of derivatives which are cured of the plasmids. These have been obtained either through heat-curing procedures (see Martinez *et al.* 1990 for a review) or by employing new procedures that allow the positive selection for loss of function (Hynes *et al.* 1989; Flores *et al.* 1992). These methods have permitted the systematic analysis of whole plasmid sets in *R. etli*, and in *R. leguminosarum* *bv.* *viciae* and *trifolii* (Hynes & McGregor 1990; Baldani *et al.* 1992; Brom *et al.* 1992; Stepkowski *et al.* 1993). Although the megaplasmids of *R. meliloti* have been recalcitrant to cure, their analysis has been carried out by elegant genetic techniques that have led to the directed generation of large deletions (Charis & Finan 1991).

Another approach widely used for the comprehensive analysis of plasmid functions is the construction of derivatives which acquire whole plasmids through genetic transference (see Martinez *et al.* 1990 for a review). The generation of complete physical maps of rhizobial plasmids (Prakash *et al.* 1981; Girard *et al.* 1991; Perret *et al.* 1991; Honeycutt *et al.* 1993), are very useful assets to the study of plasmids, including the determination of transcriptional patterns of plasmid regions (David *et al.* 1987; Fellay *et al.* 1995; L. Girard, unpublished work). The study of plasmid stability (Mercado-Blanco & Olivares 1993; Mercado-Blanco & Olivares 1994), dynamics (Brom *et al.* 1991; Romero *et al.* 1991; Flores *et al.* 1993; Romero *et al.* 1995b), and transmissibility (see below), are other useful aids for their functional and evolutionary scrutiny.

Besides the research directed to the analysis of whole plasmids, other studies have been aimed at specific genes, employing the whole array of genetic methodologies developed for *Rhizobium* (reviewed in Martinez *et al.* 1990). New strategies for the isolation of specific DNA sequences (Bourson *et al.* 1992) and for the integration of genetic information (Uchimi *et al.* 1993; Uchimi *et al.* 1995) are continually devised.

The characterization of plasmids themselves, by their presence, size and restriction fragment length polymorphisms has been used for taxonomic purposes (Schofield *et al.* 1987; Young & Wexler 1988; Demuezas *et al.* 1991; Leguerre *et al.* 1992).

Although research in *Rhizobium* plasmids has been focused mainly on the symbiotic plasmids, the participation of other replicons in symbiotic and other cellular functions has been evidenced.

Deciphering the Genetic Functions Encoded in *Rhizobium* 'Cryptic' Plasmids

Biosynthesis of Cell Surface Polysaccharides

The functions of exopolysaccharides (EPS) in the free-living state have been associated with nutrient gathering,

attachment and stress-protection, while in symbiosis they are required (in hosts which form indeterminate nodules) for successful nodule invasion and development (Leigh & Walker 1994). Strains of *Rhizobium meliloti* carry a 24 kb cluster of EPS biosynthetic genes on a megaplasmid distinct from the p Σ ym (Leigh & Walker 1994). Regulation of EPS biosynthesis is apparently controlled by plasmids in other *Rhizobium* species. For instance, the *psu* gene in the p Σ ym of *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* inhibits EPS synthesis (Bortholuz & Johnston 1987); a sequence with a similar function in *S. fredii* appears to be located in a plasmid other than the p Σ ym (Barbour & Elkan 1980).

Lipopolysaccharide (LPS) molecules are essential components of the bacterial outer membrane. In *R. leguminosarum* *bv. viciae* (Hynes & McGregor 1990), *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Baldani *et al.* 1992), and *R. etli* (Brom *et al.* 1992), genes involved in LPS biosynthesis have been localized on non-symbiotic plasmids. Mutations in plasmid-borne LPS genes cause strong alterations on the cell surface, affecting not only free-living features such as morphology, motility and aggregation, but also effective nodulation in hosts which form determinate nodules. Functional complementation (Hynes & McGregor 1990; Noel 1992; A. Garcia de los Santos, S. Brom & D. Romero unpublished work) and structural homology studies (unpublished work) strongly suggest that plasmid-borne LPS genes may be highly conserved between *R. leguminosarum* and *R. etli* strains. Notably, *R. meliloti* Rm41 also carries a gene involved in LPS biosynthesis, *lpsZ* on the *eps* megaplasmid; this gene is absent in other *R. meliloti* strains, such as RmSU47 (Williams *et al.* 1990).

These findings cast some doubt about the commonly-held view that plasmids encode determinants of episodic, dispensable nature. The profound effects of EPS or LPS loss on cell physiology clearly illustrate their necessity for bacterial survival.

Sequences Related to Metabolic Processes

Rhizobium plasmids may carry genomic sequences required for central metabolic pathways. *R. tropici* harbours duplicate genes for citrate synthase, one on the chromosome and the other on the p Σ ym. Mutations in the plasmid-borne copy provoke a decreased enzyme activity, at least in some growth conditions and also lead to diminished nodulation (Pardo *et al.* 1994). The *R. meliloti* *eps* megaplasmid also contains C₄-dicarboxylate transport genes, which have a pleiotropic effect on the utilization of many TCA cycle intermediates as growth substrates (Watson *et al.* 1988). Two loci involved in thiamine biosynthesis have also been ascribed to the same megaplasmid (Finan *et al.* 1986). Superoxide dismutase enzyme activity is plasmid-conditioned in *R. leguminosarum* *bv. trifolii*, and in this organism there are two electromorphs of both hexokinase and carbanilate kinase; one electromorph of each enzyme is lost

upon plasmid curing. Enzymes required for the use of nitrate as nitrogen source also depend on the presence of plasmids (Baldani *et al.* 1992). Comparison of growth rates among parental and plasmid-cured derivatives indicates the existence of other undefined metabolic traits in *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Hynes & McGregor 1990) and *R. etli* (Brom *et al.* 1992). Derivatives cured of some plasmids of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Baldani *et al.* 1992) and *R. etli* (Brom *et al.* 1992) could not be obtained. In *R. meliloti*, approximately 200 kb of the *psj* megaplasmid were recalcitrant to deletion (Charles & Finan 1991). These data suggest that these plasmids may carry genes whose functions are essential for cellular viability.

Utilization of Plant Metabolites

Plant root exudates provide a rich source of nutrients for microorganisms. Genes required for the catabolism of some of these compounds have been localized on *Rhizobium* plasmids. The *msa* and *moc* genes, involved in the synthesis and catabolism of rhizopine, an opine-like compound in alfalfa, have been shown to be closely linked on the *psym* of a *R. meliloti* strain. Moreover, the expression of the *msa* genes is regulated through the NIFA/Ntra system, which controls the expression of N_2 fixation genes (Saint *et al.* 1993). In another *R. meliloti* strain, genes involved in the catabolism of trigonelline, stachydrine and carnitine, a group of betaines produced by *Medicago sativa*, are located on the *psym* (Goldmann *et al.* 1991). Trigonelline utilization has been shown to be associated with a non-Sym plasmid in *R. etli* (unpublished work). Catecholase catabolic genes were found in one *R. meliloti* strain out of 42 tested rhizobium bacteria. The genes were located on a non-Sym self-transmissible plasmid (Tepper *et al.* 1988).

It is possible that *Rhizobium* strains containing this kind of gene may have a selective growth advantage in the rhizosphere microenvironment. Thus, these genes correspond to the class more commonly found on plasmids: genes for episodic use, in this case, for bacteria-plant interactions.

Utilization of Aromatic Compounds and Diverse Sugars

The soil environment contains many aromatic compounds originating from root exudates and plant degradation. These compounds play multiple roles in *Rhizobium*-legume interactions as inducers of nodule development (Schultze *et al.* 1994), as chemoattractants (Parke *et al.* 1985), and as growth substrates for *Rhizobium* (Parke & Ormston 1984; Hartwig *et al.* 1991). In *R. meliloti*, deletions of the *exo* megaplasmid impede the ability to use the aromatics protocatechuic and gallicic as sole carbon sources (Charles & Finan 1991). The ability to utilize the aromatic compound catechol is encoded in the *psym* of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain (Baldani *et al.* 1992).

Utilization of diverse sugars appears to depend on plasmids other than the *psym*. The *R. meliloti* *exo* megaplasmid has been related to the utilization of melibiose, raffinose, acetosuccinate and β -hydroxybutyrate (Charles & Finan 1991). Two β -galactosidase activities have been detected in *R. meliloti*; one of them is lactose-inducible and has been ascribed to the *exo* megaplasmid (Charles *et al.* 1990). The study of the plasmid-cured derivatives *R. leguminosarum* bv. *trifolii* has shown that sequences required for the utilization of rhamnose, sorbitol, adonitol, arabinose, glycerol, lactose and maltose are distributed among diverse plasmids (Baldani *et al.* 1992).

The availability of these additional functions, contributes to the metabolic diversity of these microorganisms, and probably confers on them an adaptive advantage over other soil bacteria. Their assignment to plasmids facilitates their distribution in the population and is in agreement with the classical view of plasmids.

Nodulation Competitiveness and Symbiotic Nitrogen Fixation

In agricultural fields, native *Rhizobium* strains usually dominate nodulation over introduced strains. This poses a problem for the increase in legume productivity by inoculation with selected highly effective N_2 fixing bacteria. Analyses of plasmid-cured derivatives of *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Hynes 1990), *R. etli* (Brom *et al.* 1992), and *R. fredii* (Barbour & Elkan 1990), have shown that sequences required to achieve wild type competitive levels are distributed among various non-Sym plasmids. *R. etli* transconjugants improved their competitiveness for nodule occupancy upon the introduction of an *R. tropici* plasmid (Martinez-Romero & Rossmith 1990). A DNA region related to nodulation efficiency and competitiveness, termed *up* (nodule formation efficiency), has been assigned to a plasmid of *R. meliloti* (Soto *et al.* 1994).

The presence of determinants involved in N_2 fixation, has also been shown in *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Hynes & McGregor 1990), *R. etli* (unpublished work) and *R. meliloti* (Rastogi *et al.* 1992) non-Sym plasmids.

Whereas the above mentioned studies indicate a positive involvement of plasmid sequences in symbiosis, other reports show that some plasmids may have a negative effect on symbiotic effectivity. Loss of a 'cryptic' plasmid in strains of *R. loti* enhances their N_2 fixation and nodulation competitiveness (Pankhurst *et al.* 1986). Deletions in a 'cryptic' *R. leguminosarum* bv. *viciae* plasmid, result in effective nodulation on a previously ineffective host (Selbstschke & Lotz 1991). Also in a strain of *R. meliloti*, an increase in effective N_2 fixation was correlated to the loss of a 'cryptic' plasmid (Velasquez *et al.* 1993). The molecular basis of many of these effects is still unknown.

The symbiotic capacity of *Rhizobium* strains depends on the interaction of a great number of factors some of them being directly involved in the process while others act

indirectly. Genetic sequences related to this array of factors are distributed among the different plasmids.

Other Functions

Chaperonin-encoding genes, such as *groEL*, have been located both on the chromosome and on megaplasmids of *R. meliloti* (Kusanganon & Gupta 1993). Studies in both *Bradyrhizobium japonicum* (Fischer, 1994) and *R. meliloti* (Long *et al.* 1991) suggest their involvement in symbiosis.

Melanin production is a widespread characteristic among *Rhizobium* species (Cubo *et al.* 1988). Although its function is unknown, it has been proposed as a defence against toxic plant phenols. Melanin biosynthesis is also plasmid-encoded either by the *pSym* (Cubo *et al.* 1988) or by 'cryptic' plasmids (Hynes & McGregor 1990; Mercado-Blanco *et al.* 1993).

An acid-tolerant phenotype in a strain of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* has also been associated with a plasmid (Chen *et al.* 1993).

As described in this section many dissimilar functions, either housekeeping or dispensable, may be plasmid-borne. The location of many of these traits was discovered during studies on the genetic basis of a particular characteristic, rather than from more comprehensive studies of the role of plasmid *per se*. Research along this line will probably reveal new plasmid-linked phenotypes in years to come.

Factors Influencing Plasmid Evolution

Conjugative Transfer

Conjugative transfer of indigenous plasmids has been observed among *Rhizobium leguminosarum* strains under laboratory conditions (Johnston *et al.* 1982; Geniaux *et al.* 1993) or under conditions resembling the soil environment (Kinkle & Schmidt 1994; Rao *et al.* 1994). The transmissible plasmids vary in their transference frequency, their size and in the genetic information they carry; sometimes they correspond to the *pSym*. In addition to being self-transmissible, some plasmids may induce the mobilization of other replicons (Johnston *et al.* 1982; Mercado-Blanco & Olivares 1993; unpublished work).

Very few data are available regarding the classification of rhizobial plasmid incompatibility groups. The incompatibility between an R1 plasmid of *Agrobacterium* and as *R. leguminosarum* bv. *trifolii* *pSym* has been reported (O'Connell *et al.* 1987). We have observed the incompatibility between as *R. etli* plasmid and a Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* (unpublished work). Other data show incompatibility between some *trifolii* and *phaseoli* *pSym*s (Johnston *et al.* 1982), or between some *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* plasmids (unpublished work). Not all *pSym*s correspond to the same incompatibility group, as strains with two *pSym*s, having the same (Geniaux & Amarger 1993),

or a different (Hocrykaas *et al.* 1981) host-range have been constructed.

The analysis of chromosomal and plasmid characteristics in natural populations of *R. leguminosarum* biotvars, such as *trifolii* (Schofield *et al.* 1987), *phaseoli* (Geniaux *et al.* 1993) and *etli* (Young & Wesler 1988) and also in *R. gallicum* (Kallalaianen & Lindström 1989) supports the occurrence of natural plasmid exchange. A theoretical analysis of some of these data suggests that 10% (*R. gallicum*) or 15 to 30% (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) of all genetic types in these populations have been either the source or the recipient of a plasmid transfer event (Valdés & Piñero 1992). In fact, present *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strains apparently arose by natural transfer of the *pSym* of *R. etli* into a *R. leguminosarum* genomic background (Sergiova *et al.* 1993). Although most of the evaluations of plasmid transfer refer to the *pSym*, they may apply to other plasmids as well. These data clearly reveal the important role of plasmid transfer in the structuring of new genetic types in *Rhizobium* populations.

For a plasmid transfer event to be successful, several barriers must be surmounted. Leaving aside the barriers imposed by the transfer process itself, an incoming plasmid must defeat barriers such as restriction-modification systems and incompatibility with resident plasmids. A frequently overlooked factor is the burden that replication of a new plasmid imposes on the recipient cell. Experiments in *Escherichia coli* show that the introduction of a new plasmid reduces the fitness of the host cell. However, growth of the recipient cell under selective conditions for as few as 500 generations ameliorates the deleterious effect of the new plasmid, even under non-selective conditions (Levin 1993). Changes involved in this restoration of fitness affect either the recipient cell or both the cell and the incoming plasmid, thus being truly coevolutionary. It is reasonable to suppose that coevolutionary processes similar to these have been important in the structuring of plasmid-chromosome complexes in *Rhizobium*.

In addition to being a helpful tool for the explanation of evolutive changes, plasmid transmissibility for the construction of improved strains has been a long coveted but unfulfilled goal in N_2 fixation research. What are the mechanisms governing rhizobial plasmid transfer? This problem has not yet been addressed but we can speculate that the mechanisms may be similar to those acting for pTi transfer in *Agrobacterium* (Piper *et al.* 1993) as these species belong to the same family and share certain structural and functional features.

Genomic Rearrangements

As components of a genome that is particularly dynamic (see Romero *et al.* 1995a), plasmids in *Rhizobium* are subjected to frequent structural reshuffling. High frequency rearrangements have been observed in the plasmids of

several *Rhizobium* species (Djordjevic *et al.* 1982; Zurkowska 1982; Brom *et al.* 1991; Romero *et al.* 1991, 1993a; Selbitschka & Lotz 1991; Rastogi *et al.* 1992; Flores *et al.* 1993). Many different types of genomic rearrangements including conjugation, translocation, deletion and amplification of specific sequences participate in the frequent generation of structural diversity (see Romero *et al.* 1993a). Recombination among reiterated sequences appears to be responsible for such variation. Although many of the studies have focused on the plasticity exhibited by pSyms, these rearrangements also occur in non pSym plasmids (Brom *et al.* 1991; Selbitschka & Lotz 1991; Flores *et al.* 1993).

While the biological role of many of these rearrangements remains to be established, some of them may have beneficial effects for the host cell. For instance, the deletions in a *R. leguminosarum* bv. *viciae* 'cryptic' plasmid discussed above, lead to effective nodulation on a previously ineffective host (Selbitschka & Lotz 1991). In *R. etli*, a tandem amplification in the pSym endows an increase in N₂ fixation, at least in some genomic backgrounds (unpublished work). Recombination events between different pSyms have been implied in the generation of a hybrid symbiotic plasmid (Christensen & Schubert 1983). Additional work is required in order to gain more insight into the forces that have contributed to the structuring of the plasmid component as we see it today.

Conclusions and Perspectives

The data presented in this review indicate that the *Rhizobium* genome is organized in differently sized replicons (chromosome plus plasmids) which together constitute a functional unit.

Bacterial plasmids have generally been regarded as molecules conferring additional features to an already complete genome. This may not apply to *Rhizobium* plasmids which have been shown to carry genes involved in basic metabolic functions, the synthesis of cellular components and the utilization of growth nutrients. Many of these genes indirectly affect symbiotic traits but the question remains if some of them (or others still not described) have a direct involvement in symbiosis. The presence of indispensable genetic information on plasmids has not been conclusively demonstrated but is strongly suspected due to the inability to cure different *Rhizobium* strains of some plasmids. It is also notable that the functions are not concentrated on a single plasmid. In the cases where a comprehensive analysis of plasmid functions has been made (Hynes & McGregor 1990; Baldani *et al.* 1992; Brom *et al.* 1992), curing of almost every plasmid reveals important phenotypes, either saprophytic, symbiotic or both. Furthermore, interplasmid functional interactions are suggested by the drastic enhancement of phenotypic effects in multiple plasmid-cured deriva-

tives (unpublished work). Thus, the functional organization of the *Rhizobium* genome is clearly multipartite, constituting a fully integrated genomic complex. What features have converged to result in this genomic organization? Genomic reiterations and insertion sequences are thought to play principal roles in this process, due to their participation in the generation of rearrangements. The interchange of genetic information caused by conjugation also should have an impact on its final outcome. Other questions which should be addressed in the future concern the implementation of new strategies to study the biological impact of such genomic organizations, the classification of the presence of vital genetic information, the definition of genetic transfer mechanisms and the comparison with other bacteria in order to determine if this type of genomic organization is exclusive to the rhizobiales.

Acknowledgements

We thank Esperanza Martínez-Romero and Rafael Palacios for critical review of the manuscript. Work from the author's laboratory was partially supported by grant IN200693 (DGAPA-UNAM).

References

- Baldani, J.I., Weever, R.W., Hynes, M.F. & Eardly, B.D. 1992 Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobium. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2308-2314.
- Barbour, W.M. & Illian, G.M. 1980 Physiological characteristics and competitive ability of plasmid-cured derivatives of *Rhizobium frasin* USDA 206. *Annals of Microbiology* 128, 1-4.
- Beveridge, A.J., Stone, C.E. & Cooper, J.E. 1992 Combined subtraction hybridization and polymerase chain reaction amplification procedure for isolation of strain-specific *Rhizobium* DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2190-2201.
- Borshbor, D. & Johnson, A.W.S. 1987 Sequence of *psj*, a gene on the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* which inhibits emopulpyrrolic acid synthesis and nodulation and demonstration of its transcription in tobacco *in vivo*. *Another gene on the Sym plasmid*. *Molecular and General Genetics* 207, 149-154.
- Brom, S., Garcia-de las Sotillos, A., Girard, L., Devila, C., Palacios, R. & Romero, D. 1991 High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. *Journal of Bacteriology* 173, 1344-1346.
- Brom, S., Garcia-de las Sotillos, A., Staphorski, T., Flores, M., Devila, C., Romero, D. & Palacios, R. 1992 Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *Journal of Bacteriology* 174, 5183-5190.
- Campbell, A.M. 1993 Genome organization in prokaryotes. *Current Opinions in Genetics and Development* 3, 837-844.
- Charles, T.C. & Pagan, T.M. 1991 Analysis of a 1600-bilobase *Rhizobium* mutant resequenced using defined deletions generated *in vivo*. *Genetics* 127, 3-20.
- Charles, T.C., Smith, B.S. & Pagan, T.M. 1990 Lactose utilization and enzymes encoded by megaplasmids in *Rhizobium meliloti* SL47: implications for population studies. *Journal of General Microbiology* 128, 2097-2102.

- Chem, Y.P., Gertner, E. & Rolfe, B.G. 1993 Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1888-1894.
- Chenault, A.S. & Schubert, K.R. 1983 Identification of a *Rhizobium meliloti* plasmid coding for nitrogen fixation and modulation genes and its interaction with pJ851, a *Rhizobium leguminosarum* plasmid. *Journal of Bacteriology* **150**, 592-599.
- Cohen M.T., Brown, S., Weaver, A.M., Brenner, J.E. & Ruiz-Sánchez, J.E. 1988 Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1812-1817.
- Davitt, M., Demergut, O., Pogranec, P. & Kagan, D. 1987 Transcription patterns of *Rhizobium meliloti* symbiotic plasmid: identification of *nifA*-independent fix genes. *Journal of Bacteriology* **160**, 2239-2244.
- Demont, D.H., Riedel, J., Watson, I.M. & Gibson, A.H. 1991 Genetic diversity among *R. leguminosarum* bv. *viciifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3489-3493.
- Djordjević, M.A., Zarkovskii, V. & Rolfe, B.G. 1982 Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **151**, 550-568.
- Eckhardt, T. 1976 A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588.
- Felley, R., Perret, X., Virey, V., Broughton, W.J. & Brenner, S. 1995 Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Microbiology* **16**, 697-707.
- Finan, T.M., Kunkel, B., de Vos, G.F. & Signer, E.R. 1980 Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying epoxysuccinate and thiamine synthesis genes. *Journal of Bacteriology* **139**, 66-72.
- Fischer, H.M. 1984 Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Molecular Reviews* **38**, 332-380.
- Finan, T.M., Brown, S., Galloway, L., Davis, G., Romero, D. & Palacios, R. 1993 Gene amplification in *Rhizobium*: identification and *in vivo* cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciifolium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4932-4936.
- Gertner, E. & Amarger, N. 1993 Diversity and stability of plasmid transfer in isolates from a single field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEBS Microbiology Ecology* **103**, 251-260.
- Gertner, E., Laguerre, G. & Amarger, N. 1993 Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* derived from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology* **3**, 1-8.
- Girard, L., Flores, M., Brown, S., Romero, D., Palacios, R. & Dávila, C. 1991 Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Journal of Bacteriology* **173**, 2411-2419.
- Goldmann, A., Boivin, C., Fleury, V., Message, B., Lecœur, L., Maitte, M. & Teyssie, D. 1991 Baiting use by rhizosphere bacteria: genes essential for tryptamine, tryptoline and carnitine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 371-378.
- Herrwig, U.A., Joseph, C.M. & Phillips, D.A. 1991 Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* **98**, 797-803.
- Herrwig, U.A., McClintock, M. & Sebren, S.W.S. 1993 Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *Journal of Bacteriology* **175**, 6945-6952.
- Heurys, F.I.J., Van Brunt, A.A.N., Den Duin, R.F., M. Van Blijsterveld, G.H.S. & Schilpenhorst, R.A. 1981 Sym-plasmid of *Rhizobium meliloti* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **291**, 331-333.
- Hyman, M.F. 1980 The role of plasmids in competition between strains of *R. leguminosarum* in *Nitrogen Fixation: achievements and objectives*, eds Genshoif, F.M., Roth, L.E., Stacy, G. & Newton, W.E. p.262. New York & London: Chapman & Hall.
- Hyman, M.F. & McCarty, M.E. 1980 Two plasmids, other than the nodulation plasmid, are necessary for formation of nitrogen fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology* **6**, 367-374.
- Hyman, M.F., Chao, J., O'Connell, M.P. & Pöhler, A. 1989 Direct selection for the curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *secE* gene. *Gene* **79**, 111-120.
- Johanson, A.W.S., Hombach, G., Berwin, N.J. & Cooper, M.C. 1982 Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *Journal of General Microbiology* **120**, 85-93.
- Kajala, S. & Lindström, K. 1990 Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *Journal of Bacteriology* **173**, 5561-5566.
- Kinkle, B.K. & Schmidt, E.L. 1991 Transfer of the pea symbiotic plasmid pJ851 in nonsterile soil. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3264-3269.
- Laguerre, G., Mazurier, S.I. & Amarger, N. 1992. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEBS Microbiology Ecology* **101**, 17-20.
- Ligh, J.A. & Walker, G.C. 1994 Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in Genetics* **19**, 63-67.
- Levin, B.R. 1993 The accessory genetic elements of bacteria: existence conditions and (co)evolution. *Current Opinion in Genetics and Development* **3**, 484-486.
- Loren, S., Hinkley, E., Swanson, J., Edwards, D.W., Atkinson, E.M. & Schwedock, J.S. 1991 *Rhizobium meliloti* nodulation gene regulation and molecular signals. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, eds Hombach, H. & Verma, D.P.S. pp.127-133. Amsterdam: Kluwer Academic.
- Martinez, E., Romero, D. & Palacios, R. 1990 *The Rhizobium genome*. *Critical Reviews in Plant Science* **9**, 59-93.
- Martinez, E. & Rosenblueth, M. 1990 Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 2384-2388.
- Mercado-Blanco, J., García, F., Fernández-López, M. & Olivares, J. 1993 Melanin production by *R. meliloti* GR1 is linked to non-symbiotic plasmid pRucGR6b: cloning, sequencing and expression of the tyrosinase gene *mppA*. *Journal of Bacteriology* **173**, 5403-5410.
- Mercado-Blanco, J. & Olivares, J. 1993 Stability and transmissibility of the cryptic plasmid of *Rhizobium meliloti* GR1. *Archives of Microbiology* **160**, 477-485.
- Mercado-Blanco, J. & Olivares, J. 1994 A protein involved in stabilization of a large non-symbiotic plasmid of *Rhizobium meliloti* shows homology to eukaryotic cytoskeletal proteins and DNA-binding proteins. *Gene* **159**, 133-134.
- Noel, K.D. 1992 *Rhizobial* polysaccharides required in symbiosis with legumes. In: *Molecular Signals in Plant-Microbe Communication*, ed Verma, D.P.S. pp.341-357. Boca Raton: CRC press.
- O'Connell, M.P., Hyman, M.F., Hyman, M.F. 1987 Compatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and a *Ri* plasmid of *Agrobacterium*. *Plasmid* **18**, 156-163.

- Fambhurst, C.E., McDonald, P.E. & Reeves, J.M. 1980 Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. *Journal of General Microbiology* **132**, 2321-2328.
- Fardo, M.A., Laguna, J., Miranda, J. & Martinez, E. 1984 Nodulating ability of *Rhizobium loti* is conditioned by a plasmid encoded citrate synthase. *Molecular Microbiology* **11**, 315-321.
- Parke, D. & Ormston, L.N. 1984 Nutritional diversity of *Rhizobium* revealed by autoradiography. *Journal of General Microbiology* **130**, 1743-1750.
- Parke, D., Rivelli, M. & Ormston, L.N. 1985 Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids: comparison of *Neorhizobium japonicum* and *Rhizobium loti*. *Journal of Bacteriology* **163**, 417-422.
- Perret, X., Broughton, W.J. & Brenner, S. 1991 Canonical ordered covered library of the symbiotic plasmid of *Rhizobium sp.* NGR234. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 1923-1927.
- Piper, K.R., Beck, S. & Farrand, S.K. 1993 Conjugation factor of *A. tumefaciens* regulates T1 plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **363**, 448-450.
- Prakash, R.K., Van Veen, J.M. & Schilperoot, K.A. 1981 Restriction endonuclease mapping of *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid. *Plasmid* **7**, 271-280.
- Rao, J.R., Fenton, M. & Jarvis, B.D.W. 1994 Symbiotic plasmid transfer in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and competition between the inoculant strain ICMF2103 and trans-conjugant soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* **26**, 339-351.
- Rastogi, V.K., Bromfield, E.S.P., Whitwell, S.T. & Barton, L.R. 1992 A cryptic plasmid of indigenous *Rhizobium meliloti* possesses reiterated *nodC* and *nif* genes and undergoes DNA rearrangement. *Canadian Journal of Microbiology* **38**, 503-508.
- Romero, D., Broom, S., Martinez-Salazar, J., Girard, L., Palacios, R. & Dávila, G. 1991 Amplification and deletion of a *nodY* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. *Journal of Bacteriology* **173**, 2435-2441.
- Romero, D., Dávila, G. & Palacios, R. 1995a The dynamic genome of *Rhizobium*. In: *Bacterial genomes. Physical structure and Analysis*, eds de Bruijn, F.J., Lupski, J.R. & Weinrock, G. New York: Chapman and Hall in press.
- Romero, D., Martinez-Salazar, J., Girard, L., Broom, S., Dávila, G., Palacios, R., Flores, M. & Rodriguez, C. 1995b Discovery of amplifiable regions (replicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. CFN42. *Journal of Bacteriology* **177**, 973-980.
- Rusanganwa, E. & Gupta, R.S. 1993 Cloning and characterization of multiple *glnE*, chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti*. *Gene* **158**, 67-75.
- Saint, C.P., Wexler, M., Murphy, P.J., Tempé, J., Tate, M.E. & Murphy, P.J. 1993 Characterization of genes for synthesis and catabolism of a new rhizopine induced in nodules by *Rhizobium meliloti* Rm220-3; extension of the rhizopine concept. *Journal of Bacteriology* **178**, 5205-5215.
- Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F. & Watson, J.M. 1987 Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2942-2947.
- Schulze, M., Kumbhani, E., Rahet, P., Bure, M. & Kumbhani, A. 1994 Cell and molecular biology of *Rhizobium-plant* interactions. *International Review of Cytology* **190**, 1-75.
- Segovia, L., Young, J.P.W. & Martinez-Romero, E. 1993 Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**, 374-377.
- Setbon, V. & Lere, W. 1991 Instability of cryptic plasmids affect the symbiotic efficiency of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 606-618.
- Soto, M., Zorzano, A., Garcia-Rodriguez, F.M., Mercaderes-Blanco, J., Lopez-Lara, J.M., Olivares, J. & Toro, N. 1994 Identification of a novel *R. meliloti* nodulation efficiency *nif* gene homolog of *Agrobacterium tumefaciens* cycloindoleaminase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 703-707.
- Stephanou, T., Broom, S., Garcia-de los Santos, A., Girard, L., Dávila, G. & Palacios, R. 1993 Plasmid related phenotypes in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU443 in New Horizons in Nitrogen Fixation, eds Palacios, R., Mora, J. & Newton, W.E. p.653. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Tejedor, D., Goldmann, A., Fambourkian, N., Maille, M., Lepage, A., Chevaleyre, D., Demare, J. & Rosenberg, C. 1986 A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium apenum*. *Journal of Bacteriology* **170**, 1153-1161.
- Uchimi, T., Higashi, S. & Abe, M. 1993 A chromosome integrative vector system utilizing DNA fragments of a lysogenic phage of *R. leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* **139**, 2371-2377.
- Uchimi, T., Higashi, S. & Abe, M. 1995 Nodule formation by clover *Rhizobium* carrying chromosomal *nif* genes. *Journal of General and Applied Microbiology* **41**, 11-22.
- Valdes, A.M. & Pfeifer, D. 1992 Phylogenetic estimation of plasmid exchange in bacteria. *Evolution* **46**, 641-650.
- Velasco, E., Malvar, R., Pedrosa, P., Oazzo, F.B. & Martinez-Molina, E. 1995 Attenuation of symbiotic effectiveness by *Rhizobium meliloti* SAF22 related to the presence of a cryptic plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2033-2036.
- Watson, R.J., Chen, Y.K., Wheatcroft, R., Yang, A.F. & Han, S. 1988 *Rhizobium meliloti* genes required for C₄-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *Journal of Bacteriology* **170**, 927-934.
- Williams, M.N.V., Hollingsworth, R.J., Klein, S. & Siger, E.R. 1990 The symbiotic defect of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants is mediated by *isp27+* gene involved in heparansaccharide biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **172**, 2622-2632.
- Young, J.P.W. & Wexler, M. 1988 Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* **134**, 2731-2739.
- Zarkowicz, W. 1982 Molecular mechanisms for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology* **158**, 999-1007.

FUNCIONES CODIFICADAS EN PLÁSMIDOS DE *R. sol* CFN42.

R. etli CFN42 (anteriormente *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*) es una cepa aislada a partir de nódulos de frijol, pero capaz de formar nódulos efectivos en al menos siete especies distintas de leguminosas tropicales (Hernández-Lucas *et al.* 1995). Su genoma se encuentra constituido por un cromosoma y seis plásmidos (pCFN42a, b, c, d, e y f). El tamaño de sus plásmidos se encuentra en un rango de 150 a 600 kb, siendo el pCFN42d el plásmido que lleva la mayoría de los genes requeridos para la nodulación y fijación de nitrógeno (*nod*, *nif* y *fls*).

El análisis de las funciones codificadas en sus plásmidos no simbióticos se inició hace algunos años cuando Brom *et al.* reportaron el aislamiento de cepas curadas. En este trabajo, se obtuvieron cepas carentes de todos los plásmidos excepto de pCFN42e, del cual solo se lograron aislar tres delecciones, la mayor de ellas dio origen a un plásmido de aproximadamente 270 kb. El estudio de las cepas curadas bajo diferentes condiciones de cultivo en laboratorio, así como en simbiosis con plantas de frijol, ha permitido asociar ciertas características fenotípicas con cada uno de sus replicones (Tabla 1).

El pCFN42a tiene un tamaño aproximado de 150 kb, y es el único plásmido auto-transferible a alta frecuencia (10^{-2} , 10^{-3}). Además de su propia transferencia, incrementa 100 veces la transferencia del pSim, el cual normalmente se transfiere a muy baja frecuencia (10^{-9}) (Brom, datos sin publicar). El pCFN42a es incompatible con el plásmido Ti de *A. tumefaciens* NT1 (Brom, datos sin publicar). Hasta ahora, no se le ha podido asignar ninguna otra función, ya que como se puede observar en la Tabla 1, su ausencia no afecta el fenotipo en vida libre o simbiosis de la cepa CFN42.

El pCFN42b tiene un tamaño ligeramente menor al pCFN42a; aunque en un perfil electroforético ambos plásmidos normalmente comigran en una sola banda. En el pCFN42b se encuentra localizada una de las tres regiones que participan en la síntesis de lipopolisacárido

(región *lpsB*). Como se explicará más adelante, el lipopolisacárido (LPS) es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, el cual participa en la interacción de estas con su medio ambiente. La ausencia de la región genética *lpsB* en la cepa curada de pCFN42b, afecta la síntesis de LPS lo cual produce una serie de alteraciones fenotípicas que van desde cambios en la morfología colonial, hasta la incapacidad para inducir la formación de nódulos efectivos (Tabla 1).

Además de la región *lpsB*, en este plásmido existen secuencias que participan en la capacidad competitiva de la bacteria por ocupación de nódulos. Lo anterior se demostró al complementar la cepa pCFN42b-, con un cosmido (pDEL27) conteniendo la región *lpsB*. Aunque la cepa complementada recupera la capacidad de inducir nódulos efectivos, cuando fue co-inoculada con la cepa silvestre, ésta última ocupó el 100% de los nódulos.

La participación de la información genética del pCFN42b en el crecimiento óptimo de esta bacteria en cultivos de laboratorio, se ve reflejada en una drástica reducción de la velocidad de crecimiento de la cepa curada. En medio rico su tasa de crecimiento es un 40% menor respecto a la cepa silvestre, mientras que en medio mínimo, la tasa de crecimiento es un 60% inferior (Tabla 1).

Secuencias presentes en el pCFN42b parecen estar involucradas en la utilización de glicerol, ya que la cepa pCFN42b- es incapaz de crecer en medio mínimo cuando el glicerol es la única fuente de carbono (Cervantes 1997).

El pCFN42c tiene un tamaño aproximado de 270 kb. Es un plásmido poco estable, ya que en cultivos de laboratorio se pierde de manera espontánea con frecuencia elevada (Brom *et al.* 1991). Su pérdida no parece afectar la nodulación ni la fijación de nitrógeno, pero si la capacidad competitiva de la cepa, ya que cepas pCFN42c- son menos competitivas que la cepa silvestre. Este plásmido es necesario para el crecimiento óptimo de la bacteria en condiciones de

laboratorio, ya que su pérdida ocasiona una disminución en la tasa de crecimiento. Mientras en medio rico la tasa de crecimiento es 25% menor respecto a la cepa silvestre, en medio mínimo el crecimiento es 40% menor.

A diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre, cepas pCFN42c- no pueden utilizar dulcitol como única fuente de carbono. Tampoco pueden crecer en medio mínimo con trigonelina, un metabolito secundario presente en las semillas de leguminosas (Romero, datos sin publicar).

Como se mencionó anteriormente, el pCFN42d lleva los genes necesarios para inducir la formación de nódulos y para la síntesis y regulación de la nitrogenasa. Obviamente su ausencia incapacita a las bacterias para modular y fijar nitrógeno.

El pCFN42d es auto-transferible a muy baja frecuencia (10^{-8}), pero con la ayuda del pCFN42a, su frecuencia de transferencia se incrementa hasta 100 veces. Además de estas características genéticas, la presencia de secuencias involucradas en la síntesis de melanina, (un pigmento posiblemente relacionado con la eliminación de fenoles tóxicos producidos durante la fase de senescencia de los nódulos, ver Hawkins y Johnston 1988) ha sido sugerida, ya que en cepas pCFN42d- crecidas en un medio de cultivo con tiroxina y CuSO_4 no se ha podido inducir la síntesis de dicho pigmento (Tabla 1).

Las cepas que carecen del pCFN42d, tienen una tasa de crecimiento 25% menor que la cepa silvestre cuando son cultivadas en medio mínimo.

El pCFN42e tiene un tamaño de aproximadamente 510 kb. Cepas sin este plásmido no han podido ser aisladas. Las posibles funciones codificadas en el pCFN42e fueron estudiadas en una cepa derivada la cual sufrió una gran deleción de aproximadamente 240 kb. Esta cepa solo conserva cerca de 270 kb del pCFN42e, las cuales se ha pensado que pudieran ser indispensables para la viabilidad celular, razón por la cual no han podido ser eliminadas, aún cuando diversos métodos han sido empleados.

Aunque esta cepa es capaz de formar nódulos efectivos, su capacidad competitiva está drásticamente disminuida (Tabla 1).

Al igual que en otros plásmidos, secuencias de pCFN42e son necesarias para un crecimiento óptimo en cultivos de laboratorio. La tasa de crecimiento es 25% menor en medio rico y 60% menor en medio mínimo con respecto a la cepa silvestre. La capacidad para utilizar melibiosa como única fuente de carbono en medio mínimo, también parece estar codificada en el pCFN42e, ya que la cepa con pCFN42eΔ es incapaz de crecer en este medio (Cervantes 1997).

Para el pCFN42f se ha estimado un tamaño de 630 kb. Respecto a sus funciones simbióticas, algunas de las secuencias del plásmido son necesarias para un óptimo nivel de fijación de nitrógeno. Como se puede observar en la Tabla 1, cepas pCFN42f solo tienen un 35% de actividad específica de nitrogenasa respecto a la cepa silvestre. Adicionalmente, la capacidad competitiva de las cepas curadas es inferior a la de la cepa silvestre.

Por otro lado, aunque su crecimiento en medio rico es similar al de la cepa silvestre, en medio mínimo son totalmente incapaces de crecer.

DERIVADAS DE *R. etli* CFN42 CURADAS DE MÚLTIPLES PLÁSMIDOS.

Adicionalmente a las cepas curadas arriba descritas, las cuales carecen de un sólo plásmido, se han obtenido otras cepas derivadas con distintas combinaciones de plásmidos y una curada múltiple, en la cual sólo está presente el cromosoma y un fragmento del pCFN42e (Fig 1). El efecto que tiene la pérdida de varios plásmidos en sus características fenotípicas, tanto en simbiosis como en vida libre también fue evaluado (Brom, datos sin publicar). Este estudio demostró que entre más plásmidos pierde la bacteria, más drásticas son sus deficiencias en simbiosis y vida libre. Como ejemplo podemos mencionar a la cepa CFNX216, la cual

conserva el pCFN42b y el pCFN42d, por medio de los cuales mantiene la capacidad para nodular y fijar nitrógeno, así como el pCFN42eA (Fig.1). Su fenotipo simbiótico más drásticamente alterado es la competencia por ocupación de nódulos. Aún cuando la cepa fue inoculada en una concentración de células 1000 veces mayor que la cepa silvestre, el 100% de los nódulos fueron ocupados por la cepa silvestre.

La curada múltiple, la cual solo conserva pCFN42eA, es una cepa muy afectada en sus funciones saprofiticas, lo cual se refleja en su poca viabilidad en cultivos de laboratorio. Los datos aquí mencionados demuestran la relevancia que tienen los plásmidos de *R. etli* CFN42, no solo en simbiosis, sino también para el óptimo funcionamiento celular.

CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS AISLADAS DE PLÁSMIDOS DE *R. etli* CFN42.

El análisis fenotípico de las cepas curadas está empezando a ser complementado por algunos trabajos mucho más detallados, en los cuales regiones genéticas de los plásmidos se han mutagenizado, clonado y analizado a nivel de secuencia de ADN.

En el pCFN42b se identificó la presencia de un gen inducible por exudados de frijol (González 1996). La inserción del transposon Tn5B30 en dicho gen, provoca una disminución en el número de nódulos cercana al 25%. El análisis de secuencia de ADN de la región próxima a la inserción llevó a la identificación de dos genes: *rnrA* y *rnrB*. Se sugiere que ambos genes confieren resistencia a *R. etli* CFN42 contra algún(os) compuestos tóxicos presentes en el exudado de raíces de frijol.

Otra inserción de Tn5 en pCFN42b ha sido reportada (Miranda 1995). Esta mutación está localizada en la región promotora de un gen homólogo a *thiC* de *E. coli*, involucrado en la

síntesis de tiamina. La mutante tiene un incremento en la transcripción del operón *fixNOQP*, el cual codifica para la citocromo oxidasa terminal *cbb₃*, así como una expresión alta constitutiva del gen *thiC*. Estas alteraciones fenotípicas traen como consecuencia un incremento en la capacidad para fijar nitrógeno, ya que plantas inoculadas con la cepa mutante tienen 25% mayor contenido de nitrógeno que las plantas inoculadas con la cepa silvestre. Corriente abajo del gene *thiC*, recientemente se identificaron los genes *thiOGE* probablemente también involucrados en la síntesis de tiamina (J. Miranda, comunicación personal).

En el plásmido pCFN42e fue localizada una reiteración del gen *ccmC* mediante hibridación de ADN. Aunque no existe evidencia experimental, el producto de estos genes podría formar parte del aparato de translocación encargado de transferir el grupo hemo a los citocromos tipo c (Aguilar y Soberón, 1996)

Se han aislado del pCFN42f secuencias posiblemente relacionadas con una fijación de nitrógeno óptima (Girard, datos sin publicar). Entre ellas se encuentran: reiteraciones de los genes *fixK* (regulador transcripcional), *fixNOQP* (biogénesis de oxidasa simbiótica) y *fixGHIS* (proteínas transmembranales cuya función es desconocida). Copia de estos genes han sido detectadas en el pCFN42d. También en el pCFN42f se ha localizado una reiteración del operón *cycJLK* (biogénesis de citocromo c y fijación de nitrógeno), la otra copia se encuentra localizada en el cromosoma. Una secuencia homóloga al gen *fixL* (parte del sistema de dos componentes que activan la transcripción de los operones *fix NOQP* y *fixGHIS* y del gen *nifA*) de *R. leguminosarum* *bv. viciae* (Patschkowski *et al.* 1996) también ha sido localizada en el pCFN42f.

En el pCFN42b y como se mencionó anteriormente, se localiza la región *lpsβ*, necesaria para síntesis del LPS y la simbiosis. La presencia de esta región se demostró mediante experimentos de hibridación de DNA y complementación genética, de la derivada curada del pCFN42b con la clona pDEL27 (Brom *et al.* 1992).

El pDEL27, se aisló de un banco genómico de *R. elli* CFN42, mediante complementación de mutantes con inserciones de Tn5, alteradas en la síntesis de LPS y simbiosis (Cava *et al.* 1989).

Dentro del pDEL27 se encuentra clonado un fragmento *EcoRI* de 7.5 kb, en el cual se localiza la región *lpsB*. Aunque esta región contiene información genética indispensable para la síntesis de LPS, hasta antes de esta tesis, no se había llevado a cabo su análisis genético y molecular. Consideramos que dicho análisis, representa una interesante contribución, tanto para enriquecer el estudio de funciones codificadas en plásmidos no simbióticos, como para el avance de la genética de *lps*.

A continuación revisaremos brevemente algunas generalidades en cuanto a estructura y función del LPS y otros polisacáridos producidos por *Rhizobium*. Un análisis más detallado acerca de la genética de LPS en *Rhizobium elli* CFN42 será revisado en la introducción del artículo anexo.

ESTRUCTURA DE LA SUPERFICIE CELULAR BACTERIANA.

La célula bacteriana se encuentra rodeada por diferentes tipos de superficies (Fig.2). La más interna de ellas es la membrana citoplásmica, la cual como en cualquier otra célula, está constituida por una bicapa de fosfolípidos y proteínas. La siguiente estructura, es una capa de peptidoglicano, la cual puede ser muy gruesa en bacterias Gram-positivas (retienen el colorante cristal violeta), o muy delgada en bacterias Gram-negativas (por lo cual la tinción con el mismo colorante es imperceptible). Mientras en bacterias Gram-positivas la última superficie está constituida por un polisacárido capsular unido al peptidoglicano, en bacterias Gram-negativas después del peptidoglicano se encuentra una región acuosa rica en proteínas conocida como espacio periplásmico. La envoltura final de las bacterias Gram-negativas es una estructura

complejo llamada membrana externa. A diferencia de la bicapa de la membrana citoplásmica, en la membrana externa, solo la capa inferior está constituida por fosfolípidos. La capa superior esta constituida por el lípido A del lipopolisacárido (LPS). Unido covalentemente al lípido A se encuentra un oligosacárido denominado "core" y un polisacárido denominado antígeno-O.

POLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR *Rhizobium*.

Lipopolisacárido (LPS).

La mayoría de la información acerca de la composición química del LPS, proviene de los estudios realizados en *R. leguminosarum* y *R. etli* CFN42, aunque también existen algunos datos acerca de la composición del LPS de *R. meliloti*, *B. japonicum* y *S. fredii* (Noel, 1992). Estructuralmente, el LPS está constituido por el lípido A y un polisacárido, ambos unidos covalentemente. El lípido A, forma la región hidrofóbica de la capa superior de la membrana externa. Una característica peculiar del lípido A de *Rhizobium*, es la presencia del ácido 27-hydroxyoctacosanoico, el cual no ha sido encontrado en el lípido A de enterobacterias (Brozek *et al.* 1996) (Fig.3).

El polisacárido se proyecta hacia la parte exterior de la bacteria. Este polisacárido está formado por dos componentes el "core" y el antígeno-O. El "core" está constituido por dos residuos de ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (Kdo), una manosa, una galactosa y tres residuos de ácido galacturónico (Kadmas *et al.* 1996) (Fig.3). La estructura química del "core" está muy conservada entre cepas de *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. trifolii y viciae (Carlson, 1984).

Aunque la composición química precisa del antígeno-O no se ha determinado, se sabe que algunos de sus principales componentes son desoxi y didesoxi hexosas tales como 2-O-metilramnosa, 3-O-metilramnosa, 2-amino-2,6-didesoxihexosa y fucosa (Brink *et al.* 1990,

Carlson *et al.* 1987) (Fig.3)

En todas las bacterias Gram-negativas, el lípido A y el Kdo son esenciales para mantener la estructura celular. mutaciones que alteran la síntesis de estos dos componentes son letales (Kadrmas *et al.* 1996).

En *R. etli* CFN42, se han aislado diferentes mutaciones que alteran el "core" o el antígeno-O. Estas mutantes presentan un fenotipo Ndv- (nodules developed incompletely), en el cual, las bacterias inducen nódulos que no alcanzan su desarrollo normal, debido a que dentro del hilo de infección, cesa el proceso de invasión. Por lo tanto los nódulos son pequeños, blancos y sin actividad de nitrogenasa (Noel, 1992).

Como se mencionará mas adelante (ver artículo), por medio de la complementación de estas mutantes, se han identificado tres regiones genéticas (dos localizadas en cromosoma y otra en plásmido) involucradas en la síntesis de LPS.

La producción de LPS es indispensable para la formación de nódulos efectivos en especies de *Rhizobium* que nodulan las raíces de frijol, lenteja, chícharo, trébol, y siratro, pero no para la nodulación de raíces de alfalfa (Noel 1992).

La función del LPS en la simbiosis se desconoce. Se ha especulado al respecto pero sin ninguna base experimental (Noel 1992) que el LPS o parte de éste, al ser degradado por enzimas de la planta, puede funcionar como molécula señal permitiendo la continuación del proceso de infección. También se ha mencionado, que el LPS podría ser importante durante el transporte de las bacterias al interior de la célula vegetal por endocitosis. Asimismo, se ha contemplado la posibilidad de que pudiera funcionar como protección contra compuestos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la infección. Sin embargo, el hecho de que *R. etli* CFN42 y su mutante CE320 afectada en síntesis de LPS, muestren igual nivel de inhibición de crecimiento frente a extractos crudos de raíces de frijol (Eisenachenk *et al.* 1994), hace poco probable esta última hipótesis.

Polisacárido extracelular (EPS).

La mayoría de las cepas de *Rhizobium*, producen de manera abundante ciertos polisacáridos, los cuales se acumulan en la superficie de la bacteria o se liberan al medio ambiente. La estructura química del EPS, así como los genes que participan en su síntesis y regulación, se han caracterizado perfectamente en la cepa de *R. meliloti* 1021 (Leigh and Walker, 1994). Esta cepa produce dos tipos de EPS, el primero de ellos ha recibido varios nombres: succinoglucano, exopolisacárido ácido o EPSI. La unidad básica de este polisacárido está constituida por siete glucosas unidas a una galactosa. El EPSI se caracteriza por su capacidad para teñirse con calcofluor. Su naturaleza ácida proviene de sus sustituyentes piruvato y succinato. Además de los residuos ácidos, también presenta un grupo acetilo.

De los 22 genes que participan en la síntesis del EPSI (genes *exo*), 19 están localizados en el megaplásmido b y el resto en el cromosoma.

El segundo tipo de EPS se conoce como EPSII, su estructura química es muy diferente del succinoglucano, su unidad básica es un residuo de galactosa unido a un residuo de glucosa. El residuo de galactosa lleva sustituciones de piruvato y la glucosa está modificada por un grupo acetilo. El EPSII no se tiñe con calcofluor y requiere para su síntesis de al menos seis genes *exp*, localizados también en el megaplásmido b, así como del producto del gen *exoB* necesario también en la síntesis de succinoglucano (González *et al.* 1992).

Mutantes afectadas en la síntesis de succinoglucano muestran un fenotipo Ndv⁻, producen módulos pequeños, las bacterias solo llega a nivel de hilo de infección, y no muestran actividad de nitrogenasa (Noel 1992).

El fenotipo Ndv⁻, se puede suprimir por mutaciones en el gen cromosomal *expR*, el cual normalmente mantiene reprimida la síntesis de EPSII.

La cepa de *R. meliloti* AK631 considerada como silvestre en algunos laboratorios, no produce

succinoglucono ni EPSII por tener una mutación en el gen *exoB*. La deficiencia en ambos polisacáridos es totalmente complementada por un polisacárido capsular rico en Kdo. En su síntesis intervienen los siguientes loci: *lpsX*, *lpsY*, *lpsZ* y *flx-23* (Petrovics *et al.* 1993).

En diferentes especies de *Rhizobium* la síntesis de EPS es indispensable para la nodulación efectiva de alfalfa, *Leucaena*, trébol, chícharo y lenteja, pero no para la nodulación de frijol. La función de los EPS tampoco ha sido determinada experimentalmente. Las especulaciones le atribuyen funciones similares a las propuestas para LPS.

β -glucanos.

Rhizobium y *Agrobacterium* producen varios tipos de β -glucanos. El más estudiado de ellos es el β -1,2 glucano, un oligosacárido cíclico, constituido por aproximadamente 20 residuos de glucosa con enlace β -1,2. Los β -glucanos se localizan principalmente en el espacio periplásmico, o se secretan al medio ambiente (Noel, 1992).

Mutaciones en los genes *chvA* y *chvB* de *A. tumefaciens*, dejan de sintetizar los β -glucanos y se vuelven avirulentas. Genes funcionalmente homólogos se han localizado en la cepa de *R. meliloti* 102F34 y han sido denominados *ndvA* y *ndvB*. Los nódulos inducidos por mutantes en estos genes, tienen un desarrollo anormal, carecen de bacteroides y por lo tanto, no fijan nitrógeno (Dylan *et al.* 1986). Algunos experimentos indican que este polisacárido participa en la adaptación de la célula bacteriana a cambios osmóticos del medio ambiente (Dylan *et al.* 1990) pero no se sabe si dicha función se relaciona con el fenotipo simbiótico.

Otro tipo de polisacáridos poco caracterizados, son los glucanos cíclicos con enlace β -1,3 y β -1,6 descritos en *Bradyrhizobium* spp. y los largos glucanos lineales con enlaces β -1,4 (fibrillas de celulosa) encontrados en la superficie de *R. leguminosarum* (Noel, 1992).

OBJETIVOS

Como se mencionó en la introducción, la importancia de la información genética contenida en los plásmidos de *Rhizobium*, ha sido plenamente demostrada mediante el estudio de cepas curadas. Sin embargo este análisis representa una visión muy general de las funciones codificadas en plásmidos.

Creemos que el siguiente nivel de investigación en el campo, forzosamente requiere de un análisis genético y molecular de las secuencias de ADN involucradas con algún fenotipo de interés. De hecho algunas mutaciones dentro del pCFN42b ya han sido caracterizadas (ver introducción).

Con la finalidad de contribuir al análisis estructural y funcional del pCFN42b de *R. etli* CFN42, llevamos cabo el presente trabajo de tesis.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Llevar a cabo la caracterización genética y molecular de la región *lpsB*, localizada en el pCFN42b de *R. etli* CFN42, la cual es indispensable para síntesis de LPS y simbiosis.
2. Analizar si la región *lpsB* está estructuralmente y funcionalmente conservada en el genoma de otros miembros de la familia Rhizobiaceae.
3. Determinar mediante estudios de incompatibilidad e hibridación de ADN la posible relación entre los plásmidos que conservan el locus *lpsB*.

Characterization of Two Plasmid-borne *lpsB* Loci of *Rhizobium etli* Required for Lipopolysaccharide Synthesis and for Optimal Interaction with Plants

Alejandro García-de los Santos and Susana Brem

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México
Received 13 March 1987. Accepted 11 June 1987.

In *Rhizobium etli* CFN42, both the symbiotic plasmid (*psd*) and plasmid *B* (*pb*) are required for effective bean nodulation. This is due to the presence on plasmid *B* of a region (*lpsB*) involved in lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis. We report here the genetic array and functional features of this plasmid-borne region. The sequence analysis of a 3,995-bp fragment revealed the presence of a transcriptional unit integrated by two open reading frames (*lpsB1* and *lpsB2*) essential for LPS biosynthesis and symbiosis. The *lpsB1* encodes a putative 193 amino acid polypeptide that shows strong homology with glucosyl-IP and galactosyl-IP transformers. The deduced amino acid sequence of the protein encoded by *lpsB2* was very similar to that of proteins involved in surface polysaccharide biosynthesis, such as *Pseudomonas aeruginosa* WgPM, *Bordetella pertussis* BpL1, and *Yersinia enterocolitica* Trac2. DNA sequences homologous to *lpsB1* and *lpsB2* of *R. etli* CFN42 were consistently found in functionally equivalent plasmids of *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strains, but not in *R. meliloti*, *R. loti*, *R. tropicum*, *R. phaseoli*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, and *Azorhizobium*. Even though *Rhizobium* spp. *Azorhizobium* do not share *lpsB* sequences, their presence is required for crown-gall tumor induction by *R. etli* transconjugants carrying the T1 plasmid.

Additional keywords: nitrogen fixation.

Soil bacteria of the genus *Rhizobium* are able to induce the formation of nitrogen-fixing nodules on roots of leguminous plants. This symbiotic interaction requires the expression of many bacterial and plant genes.

The genetic information in *Rhizobium* is distributed among the chromosome and numerous large plasmids. The molecular characterization of the *Rhizobium* genome has been focused mainly on the symbiotic plasmid (pSym), where most of the genes required for symbiotic nitrogen fixation are located. Many of these genes have been isolated and significant advances have been made in the study of their structure, regula-

tion, and functional role (Schultze et al. 1994).

Plasmids other than the pSym may also influence the symbiotic process, by encoding functions such as biosynthesis of surface polysaccharides, nodulation competitiveness, and nitrogen fixation (see García-de los Santos et al. [1996] for a review). However, very few sequences from these plasmids have been isolated and characterized at the molecular level. The best-studied sequences from a nonsymbiotic plasmid are those located on the *exo* megaplasmid of *R. meliloti*, which are involved in exopolysaccharide (EPS) biosynthesis (Leigh and Walker 1994) and C₂-dicarboxylate transport (Watson 1990), and the *nfe* genes, which are located on a self-transmissible plasmid of *R. meliloti* GR4 and are involved in nodule efficiency and competitiveness (Soto et al. 1994). *R. etli* CFN42 (formerly *Rhizobium phaseoli* [Segovia et al. 1993]) contains six plasmids (ps to pd), ranging in size from 180 to 500 kb (Quinto et al. 1982). Analysis of derivatives cured of each individual plasmid has shown that in addition to the symbiotic plasmid *pd*, a second plasmid, *pb*, is also indispensable for nodule formation, due to the presence on this plasmid of sequences required for lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis (Brem et al. 1992).

LPS is the major structural component of gram-negative bacteria outer membrane, and plays an important role in bacteria-host interactions. Although its precise function in the symbiotic process is still unclear, it has been suggested that it participates in evasion of plant defense mechanisms, or in bacteroid release into the nodules (Noel 1992).

Mutants of *R. etli* CFN42 defective in LPS biosynthesis have been isolated through Tn5 insertion. Such mutants are less glossy than the wild type, clump in liquid culture, are nonmotile on swarm plates, lack O-antigen in the LPS, and induce the formation of incompletely developed (Nod⁻Fix⁻) nodules (Cava et al. 1989). Three distinct genetic *lps* regions have been identified. Two separate regions, named α and γ , have been associated with the chromosome, and a third one, named β , has been located on *pb* (Brem et al. 1992; Noel 1992). The *lpsB* is the best characterized of these three LPS regions. It comprises nine complementation groups spanning over 18 kb of chromosomal DNA (Cava et al. 1990). Partial chemical characterization of the LPSs synthesized by strain CFN42 and derivatives with mutations in the α region (Carlson et al. 1987, 1989) led to the assignment of probable biosynthetic functions for particular genetic loci in this region

Corresponding author: Alejandro García-de los Santos. Telephone: (52) (73) 17 38 67; Fax: (52) (73) 17 55 81; E-mail: aefm@cfm.unam.mx

Nucleotide and/or amino acid sequence data are to be found at Oak-Ridge accession number U56723.

(Carlson et al. 1995). However, definitive confirmation of the biochemical function of individual gene products is still lacking. A common *lps* locus located on the chromosome of *R. leguminosarum* bvs. *viciae* and *phaseoli* has been recently described. Its 2-kb region contains two genes, apparently involved in the sequential addition of galactose and *lps* to the core tetrasaccharide. The name *8-lps* has been suggested for this locus since these genes do not correspond to any of the previously identified regions (Allaway et al. 1996).

In contrast to the well-characterized *lps*, little information is available on the plasmid-borne *lpsB* region. Within this region, contained in the 7.5-kb *EcoRI* fragment of pDEL27 (Brink et al. 1990; Cava et al. 1989), only one Tn5 insertion affecting LPS synthesis has been located (Cava et al. 1989). pDEL27 complements an LPS-*Ndv*⁻ Fix⁻ plasmid-less derivative of *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 (Hynes and MacGregor 1990) and a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 Tn5 mutant (Brink et al. 1990) for the flocculation phenotype characteristic of LPS mutants and for effective nodulation. These data suggest that homologous sequences could be located on plasmids of these strains. Support for this proposal would be gained by visualizing the structural homology among them and by showing that *R. leguminosarum* bvs. *viciae* and *trifolii* LPS sequences also complement the *R. elii*, as well as their own LPS derivatives.

In contrast to *R. elii* CFN42, in which, in addition to the pSym, the presence of the *lpsB* region of plasmid B is essential for nodulation, the *A. tumefaciens* GM19023 strain harboring only the pSym from *R. elii* CFN42 induces nodule formation on bean plants (Brom et al. 1988). Such data suggest a functional equivalence among surface polysaccharides from both *A. tumefaciens* and *R. elii*.

To initiate the analysis of *R. elii* plasmids other than the pSym, we chose the *lpsB* region of plasmid B as the starting symbiosis. In this paper, we report its genetic analysis, as well as the DNA sequence of two open reading frames (ORFs) designated *lpsB1* and *lpsB2* that are indispensable for LPS biosynthesis and symbiosis. Also, we determined the distribution of these *lpsB* ORFs among *Rhizobiaceae* by structural hybridization, complementation, and examined their involvement in crown-gall tumor induction.

RESULTS

Genetic analysis and nucleotide sequence of the *lpsB* region

A 7.5-kb *EcoRI* fragment carried by plasmid pDEL27 was previously identified as the *lpsB* region of *R. elii* CFN42, through complementation of insertional LPS mutants (Brink et al. 1990; Cava et al. 1989). The restriction map of this fragment is shown in Figure 1A. Four subclones were constructed and analyzed for complementation of the Tn5 mutant CE168 and the pb-cured derivative CFNX230. Among the clones tested, pAGS10 was able to complement both mutants for flocculation, nodulation, and nitrogen fixation, while pAGS11 and pAGS13 were unable to complement either. Clone pAGS15 complemented only the insertional mutant CE168. The fact that the plasmid-cured mutant CFNX230 was not complemented by pAGS15 suggests that, in addition to the gene interrupted by Tn5 in strain CE168, at least another gene is required for LPS synthesis. To confirm this possibility, the

EcoRI-*BamHI* fragments (3,595 bp) from pAGS10 was sequenced as described in Materials and Methods, with the clones shown in Figure 1B.

The DNA sequence of this fragment together with the deduced amino acid sequences are shown in Figure 2. Analysis of the DNA sequence shows the presence of one incomplete ORF, ORF1, and two complete ORFs, *lpsB1* and *lpsB2* (Fig. 2). The deduced amino acid sequence of each coding region was compared with the protein data bases contained in the NCBI (see Material and Methods). Sequences similar to polypeptides encoded in ORF1, *lpsB1*, and *lpsB2* are shown in Table 1. The incomplete ORF1 (520 bp) constitutes the 3' region of a hypothetical gene. The product encoded by this partial ORF (173 amino acids) is 60% identical to the carboxy terminus of *R. leguminosarum* RepC (Turner and Young 1995) and *A. rhizogenes* RepC (Nishiguchi et al. 1987) proteins involved in plasmid replication.

Downstream of ORF1, we located *lpsB1*, which is 582 bp long and potentially encodes a 193 amino acid protein. ORF1 and *lpsB1* are separated by a noncoding 258-bp track, which contains a potential σ^{70} promoter, and a putative ribosome binding site (Fig. 2).

The polypeptide encoded by *lpsB1* shows high-level sequence similarity with a number of proteins (Table 1). Among them are Cap5M and Cap8M, whose precise function is unknown, although they are involved in the synthesis of capsular polysaccharide (CPS) in *Staphylococcus aureus* (Sau and Lee 1996). A significant homology over the entire length of the protein was also found with *Campylobacter jejuni* RfBP, *R. leguminosarum* Psa2, *R. meliloti* ExoY, *Salmonella enterica* RfBP, *Vibrio cholerae* Orf7, and *Anabaena* RfBP. All of them are potential galactosyltransferases involved in the synthesis of surface polysaccharides. The *lpsB1* protein also showed a significant similarity with the C-terminal part of *S. typhimurium* RfBP and *Ranibacterium campylobacter* GUMd, the best studied sugar transferases. RfBP is a galactosyltransferase, which catalyzes the transfer of UDP-galactose to the C55 lipid carrier. GUMd catalyzes the transfer of UDP-glucose to an isopentenyl phosphate carrier. Both enzymes participate in the first step of polysaccharide synthesis.

The alignment of the amino acid sequences of *lpsB1* with Psa2 (Bothkop et al. 1988), ExoY (Müller et al. 1993), GUMd (Cohlin and Cook 1990), and *S. typhimurium* RfBP (Jiang et al. 1991) is shown in Figure 3. In addition to the conserved amino acids, several residues in the potential transmembrane regions are also highly conserved. The *lpsB2* gene contains 2,052 bp and presumably encodes a protein of 683 amino acids (Fig. 2). The *lpsB1* and *lpsB2* genes are separated by a noncoding region of 123 bp in which no σ^{70} promoter sequence was detected by sequence analysis. This *lpsB2* is preceded by a putative Shine-Dalgarno ribosome-binding site.

Analysis of the deduced amino acid sequence of *lpsB2* indicates that this polypeptide shows significant similarity with proteins required for polysaccharide synthesis (Table 1). The most striking similarity was found with the products of *Pseudomonas aeruginosa* wppM, *Bordetella pertussis* bptL, and *Yersinia enterocolitica* IIGG over their entire lengths. More limited homology was found among the *lpsB2* and other smaller proteins (Table 1): *Vibrio cholerae* ORF11, *Neisseria meningitidis* GalE, *N. meningitidis* RfBP, *R. meliloti* ExoB,

and *N. gonorrhoeae* RFB. The homology of these proteins with the LpsB2 extends from the middle of the protein to the C-terminal end (Fig. 4). GalE and EcoII enzymes catalyze the epimerization of UDP-glucose to UDP-galactose, while RFBs are enzymes involved in synthesizing 6-deoxy and disaccharide sugars.

The alignment of the amino acid sequence from WpbM (Barrowa et al. 1996), BglI (Allan and Minkell 1995), TruG (Shenolik et al. 1995), EcolI (Guanzotta et al. 1991), GalE (Jennings et al. 1993), and *N. meningitidis* RFBs (Jennings et al. 1993) with LpsB2 is shown in Figure 4. As can be seen, the degree of homology among all these proteins increases toward the C-terminal end: *P. aeruginosa* (61.2% identity), *B. pertussis* (58.9% identity), *N. meningitidis* (56% identity).

All these proteins have potential transmembrane domains analogous to those observed in LpsB2 (Fig. 4).

As in other epimerases (Wyk and Reeves 1989) and dehydrogenases (Macpherson et al. 1994), a putative NAD-binding domain was also located in all seven proteins between amino acids 305 and 335. These sequences align very well with the consensus fingerprint proposed by Wierenga et al. (1986), especially in the three glycine residues and the acid residue at the end of the fingerprint, which are strictly required for the B₆ pyridoxal three-dimensional structure of NAD-dependent proteins. (Fig. 4).

The precise site of the Tn5 insertion of strain CE168 was mapped by sequencing two polymerase chain reaction (PCR) products (see Materials and Methods) and found to interrupt the *lpsB2* near to its C-terminal end (Fig. 2).

Localization of sequences homologous to *R. etli* CFN42 *lpsB1* in rhizobia.

The 7.5-kb *EcoRI* fragment from pDEL27 was subcloned in pSPUD202 and used as probe in high stringency hybridizations with blot of *EcoRI* digested genomic DNA of different strains (Table 2). Homology was detected in all *R. etli* (9 strains), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (3 strains), and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (6 strains) tested. Homology was not detected in *R. meliloti* (5 strains), *R. tropici* (8 strains), *Rhizobium* sp. NGR 234, *R. fredii* USDA 191, *R. loti* NZP 2037, *A. caulinodans* ORS 571, *B. japonicum* (3 strains), and *A. tumefaciens* (4 strains).

Plasmid profiles from the *R. etli* and *R. leguminosarum* strains were also hybridized with an internal probe of *lpsB1* (see Materials and Methods) and with pAGS4 containing an internal fragment of *lpsB2*. In all cases, homologous sequences to both ORFs were present in the same plasmid. However, the size of the hybridizing plasmid varied among strains. Some examples are shown in Figure 5.

Functional equivalence among *R. etli* and *R. leguminosarum* plasmid-borne LPS sequences.

The *lpsB*-plasmid cured derivatives of two *R. etli* strains (CFN42 and TAL182) and one *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (ANU 843) strain were used as receptors to construct transconjugants containing *R. etli* (pCFN42b), pTAL182a, pVikingB), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (pVF39c), or *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (pANU843b) *lpsB*-carrying plasmids. The free-living and symbiotic phenotype of these transconjugants was determined (Table 3). It can be seen that all the plasmids cross-complement the plasmid-less derivatives for

flocculation and motility as well as for effective nodulation. Despite repeated attempts, no transconjugants could be obtained with a plasmid-cured derivative of *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 as receptor.

lpsB1 is required for tumor induction by rhizobia harboring T1 plasmids.

Rhizobia carrying *Agrobacterium* T1 plasmid are capable of inducing tumor formation (Hootykas et al. 1977). We took advantage of this fact to determine if the surface polysaccharide alteration of a *R. etli* CFN42 *lpsB* mutant affects the tumor formation process. The T1 plasmid of *A. tumefaciens* strain NT1 was introduced into the wild-type *R. etli* strain CFN42, its *pb*' derivative (CFNX183), and finally the *pb*' transconjugant complemented with the *lpsB*-carrying cosmid pDEL27 (CFNX188). Interestingly, plasmid A of CFN42 was always lost upon introduction of the T1 plasmid, suggesting that these plasmids are incompatible.

The tumor-inducing capacity of the different derivatives was examined on *Kalanchoe* plants (Table 4). In plants inoculated with *A. tumefaciens* NT1, CFNX227 (CFN42/pT1), or CFNX229 (CFNX188/pT1), the presence of tumors was evident 3 weeks after inoculation, whereas, in plants infected with the *lpsB*' derivative (CFNX228), only after 6 weeks did tumors start to emerge. The pT1 carried by strain CFNX228 was introduced by conjugation into *A. tumefaciens* GMI9023. The resulting strain (GMI9023-1) formed visible tumors 3 weeks after inoculation, indicating that the altered phenotype of CFNX228 was solely due to the absence of the *lpsB*'-carrying plasmid (Table 4).

DISCUSSION

In this paper, we have described the identification of two ORFs, *lpsB1* and *lpsB2*, located in the *lpsB* region of pb of *R. etli* CFN42. The genetic analysis of this region indicates that both ORFs are indispensable for LPS biosynthesis and nodule infection. pAGS15 has a deletion covering 399 bp from the 5' end of *lpsB1*. The presence of an incomplete *lpsB1* impaired the ability of pAGS15 to complement the CFNX230 *lpsB*' derivative, which lacks both *lpsB1* and *lpsB2*, but did not affect its capacity to complement the *lpsB2*:Tn5 mutant (CE168). CFNX230 could only be complemented by pAGS10 containing the entire *lpsB1* and *lpsB2* genes. The presence of a putative σ^70 promoter upstream of *lpsB1* (Fig. 2) and the absence of a transcription termination structure in the spacing sequence between *lpsB1* and *lpsB2* support our hypothesis that *lpsB1* and *lpsB2* form a transcriptional unit. If this is true, the *lpsB2* of pAGS15, which lacks the promoter region, is probably transcribed from the *Escherichia coli* *lacZ* promoter, as has been reported for other *Rhizobium* genes cloned in plasmids carrying the *lacZ* promoter (Müller et al. 1993). *lpsB14* and *lpsB2* seem to be the only genes present in this region of pb involved in LPS biosynthesis, as the sequence upstream of *lpsB1* was found to be homologous to a gene involved in replication (pGC3), and the sequence downstream of *lpsB2* could be deleted without altering LPS biosynthesis.

The core oligosaccharides of *R. etli* and *R. leguminosarum* LPS have been shown to have a similar composition, constituted by two Kdo, one galactose, one mannose, and three galacturonic acid residues (Carlson et al. 1995). pDEL27 com-

pletely restores a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* *lpsB* mutant whose chemical composition displayed a drastic reduction in galactose and galacturonic acid as well as absence of the O-antigen (Brink et al. 1990). These chemical composition data, plus the striking similarity of *LpsB1* with galactosyltransferases, suggest that *LpsB1* may be responsible for the transfer of galactose or galacturonic acid to the core oligosaccharide. The activity of galactosyltransferase has recently been ascribed to the product of *lpcA*, a chromosomal gene located in the 6-8 tag region of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* RU301 (Allaway et al. 1996). The role of *LpcA* as a galactosyltransferase is supported by the complementation of a *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 chromosomal mutant in which the galactose residue from the core tetrasaccharide is missing. *LpsB1* is not able to substitute for *LpcA*, as a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* *lpcA* mutant is not complemented by a cosmid corresponding to *R. etli* CFN42 *lpsB* region (Allaway et al. 1996). Also, the amino acid sequences of *LpcA* and *LpsB1* show a low level of similarity (21% identity, 47% similarity). To explain these data, we propose that *LpsB1* and *LpcA* are different sugar transferases, one of them being responsible for the transfer of galactose and the other for the transfer of galacturonic acid.

The biosynthetic pathways of bacterial polysaccharides have been shown to be linked (Breedveld et al. 1993; Diebold and Noel 1989). Similar to LPS, the EPS of *R. etli* and *R. leguminosarum* contain galactose (Diebold and Noel 1989; Casner-Cremere et al. 1990). Additionally, galactose has also been found in *R. leguminosarum* CPS (Zevenhuizen and Van Neerven 1983); these data hint that the putative galactosyltransferase encoded by *lpsB46* is a common link in the synthesis of LPS, EPS, and CPS.

lpsB2 codes for a putative polypeptide of 683 amino acids, which showed strong homology with WbpM from *P. aeruginosa*, BpII from *B. pertussis*, and TraG protein from *Y. enterocolitica* serotype O:3. Although the N-terminal part of *LpsB2*, WbpM, BpII, and TraG showed the lowest level of homology among them (31% identity and 56% similarity, average), three potential transmembrane domains were found to be highly conserved in this fragment in all four proteins (Fig. 4), indicating the possibility that the N-terminal portions of these proteins have a similar function: anchoring the protein to the inner membrane.

Similar to that reported for WbpM and BpII, protein sequences, the region extending from amino acid 310 to the C-terminal end of *lpsB2* showed limited homology (21% identity, 46% similarity) to prokaryotic epimerases and dehydratases, including the ExoB protein from *R. meliloti*, which catalyzes the epimerization of UDP-glucose to UDP-galactose. Previous reports have shown that *R. meliloti* and *Rhizobium* sp. (Acacia) *exoB* mutants have multiple carbohydrate defects, including LPS biosynthesis (Leigh and Lee 1983; López-Lara et al. 1993). We obtained derivatives of strain CE168 harboring the plasmid pMB2603 that contains the *exoB* gene of *R. leguminosarum* (Carter-Cremere et al. 1990); however, the transconjugants were not complemented by this plasmid (data not shown). Furthermore, Southern blot hybridization with the *lpsB2603* as probe showed sequences homologous to *exoB* located on the chromosome of *R. etli* CFN42 (data not shown). The GDP-glucose 4,6-dehydratase enc enzyme involved in the synthesis of 6-deoxy and didoxy sugars (Wang

and Gabriel 1969). These kinds of sugars have been localized in the O-polysaccharide of *R. etli* CFN42. Since *R. etli* mutant CE168 lacks the O-antigen, *lpsB2* could be involved in the synthesis of the 6-deoxy or didoxy sugar that links the O-antigen to the core oligosaccharide.

In the present work, we have demonstrated that all *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. *viciae* and *trifolii* strains tested share a common *lps* region, constituted by genes *lpsB1* and *lpsB2*, which are structurally homologous to those of *R. etli* CFN42. Furthermore, this region was always localized on a plasmid, allowing us to conclude that the presence of an *lpsB* plasmid is a widespread feature among, and confined to (see below), *R. etli* and *R. leguminosarum* strains.

Here, we have further shown that the native *lpsB* plasmids from strains of either *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, or *R. etli* fully restore the phenotype of *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* plasmid-cured derivatives.

In an extensive screening, in which a variety of *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* strains were probed with the *R. etli* *lpsB* region, no homologous sequences were found under our hybridization conditions. These data could be explained by a complete absence of, or a high divergence for, these loci in these genera.

Sequences homologous to *R. etli* CFN42 *lpsB* were not found in the different *Agrobacterium* strains analyzed, even though, as has been previously reported, *A. tumefaciens* GM19023 harboring only the pSym from *R. etli* CFN42 is capable of eliciting nodule formation on *Phaseolus vulgaris* roots. Despite the fact that these species do not share *lpsB* sequences, we have demonstrated that the surface polysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobacterium* are functionally equivalent for symbiosis and crown-gall tumor induction.

The conservation of key sequences for bacterial surface polysaccharide biosynthesis in plasmids of *R. etli* and *R. leguminosarum* is an unexpected feature, as these organisms belong to taxonomically diverse lineages (Martinez-Romero 1994) with different geographical origin and host range. We have recently performed hybridization experiments with random clones containing sequences from pCFN42 as probes. Our results show that *R. leguminosarum* plasmids pANU843b and pVF39c share other sequences besides the *lpsB* genes (A. Garcia-de los Santos, unpublished). Furthermore, we have found that pCFN42b and pANU843b belong to the same incompatibility group (A. Garcia-de los Santos, unpublished). These results suggest a broader relationship among these plasmids, not confined to the *lpsB* region.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.

The different strains and plasmids used in this work are listed in Table 2. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* strains were grown on PY (Noel et al. 1984) at 30°C. *E. coli* and *Agrobacterium* strains were grown on LB (Miller 1972) at 37 and 30°C, respectively. Antibiotics were added at the following concentrations: nalidixic acid, 20 µg ml⁻¹; rifampicin, 100 and 50 µg ml⁻¹ for *Agrobacterium* and *Rhizobium*, respectively; neomycin, 60 µg ml⁻¹; kanamycin, 30 µg ml⁻¹; spectinomycin, 75 µg ml⁻¹; tetracycline, 10 and 75 µg ml⁻¹ for *E. coli* and *Rhizobium*, respectively; carbenicillin, 100

$\mu\text{g ml}^{-1}$; chloramphenicol 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Sucrose was added at a final concentration of 12.5% (w/v/v).

Genetic manipulation and bacterial mating.

Rhizobium derivatives carrying *Tn5-sac*-*mob* insertions in plasmids were obtained as previously described (Hynes et al. 1989). The *Tn5-sac-mob*-labeled derivatives were used to generate plasmid-cured derivatives through selection of sucrose-resistant derivatives as described (Brown et al. 1992), and also as donors to construct transconjugants harboring them. Transconjugants were obtained by conjugation, in triparental crosses with pRKN213 (Figurski and Hellmuth 1978) as a helper and selecting for suitable markers on PY plates. Transformation of *E. coli* HB 101 strains (Boyer and Roulland-Dussoix 1969) was done as described (Sambrook et al. 1989). The strains constructed in this work are listed in Table 2.

Filter-blot hybridization and plasmid profiles.

Genomic DNA was isolated, digested with *EcoRI*, electrophoresed in 1% agarose gels, blotted onto nitrocellulose membranes, and hybridized under stringent conditions as described elsewhere (Flores et al. 1987). Plasmid patterns were visualized by the Eckhardt (Eckhardt 1978) technique. The plasmids used as probes were purified by the alkaline lysis method (Sambrook et al. 1989) and labeled with a [^{32}P]dCTP by nick translation (Rigby et al. 1976). The *lpsB1* internal fragment used as probe was prepared by PCR amplification of pAGS10 with primers 5'GTATCGGGCTTTCATC 3' and 5'CCCTCAGAAACAGGATGC 3'. Reactions were carried out with the GeneAmp PCR reagent kit (Perkin Elmer, Branchburg, NJ).

Nodulation, nitrogen fixation, and virulence assays.

For plant tests, surface-sterilized *P. vulgaris* cv. Negro jamapa seeds were germinated on soft agar plates (8 g/liter). Two-day-old seedlings were transferred to 250-ml Erlenmeyer flasks with Fahraeus agar medium (Fahraeus 1957), without added nitrogen, and inoculated with overnight-grown cultures. Plants were incubated for 15 days at 28°C. Nodulation was scored at day 15, and acetylene reduction was assayed as previously described (Martínez et al. 1987). For *R. trifolii* plant tests, surface-sterilized *Trifolium subterraneum* seeds were inoculated on plants of Fahraeus agar medium in glass tubes (23 × 200 mm). Plants were grown for 7 weeks at 25°C in racks wrapped in aluminum foil to shade the roots and plant dry weight was then used to estimate nitrogen fixation activity. In both cases, bacteria were isolated from surface-sterilized nodules crushed on PY plates. Single colonies were tested for antibiotic resistance and plasmid pattern. For tumorigenicity of *Agrobacterium* or *Rhizobium* strains carrying the T1 plasmid, they were grown on PY medium containing 0.1 mM acetylserine and 10 mM glucose. Inoculation was carried out by gynecuring the stems of *Ranunculus* plants with a sterile needle and applying the appropriate strain with a toothpick. Plants were maintained at 23°C, and scored weekly for the presence or absence of tumors at each wound site. All plant assays were repeated three times.

DNA sequencing.

Five DNA restriction fragments from pAGS10 (Fig. 1).

were cloned into the Bluescript II SK(-) phagemid vector (Stratagene, La Jolla, CA) and transformed into *E. coli* DH5 α (Sambrook et al. 1989). An internal fragment of *lpsB1* was obtained by cloning the 230-bp *SalI-SalI* fragment of pAGS10 in the pGEMBlue vector (Amersham, Buckinghamshire, UK). Double-stranded DNA was isolated with the Wizard Miniprep DNA purification system (Promega, Madison, WI), and a sequence with a combination of custom-made (Bio-synthesis, Lewisville, TX) and universal oligonucleotide primers with the Tag DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit and automatic 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNA was sequenced at least twice on both strands.

Analysis of nucleotide and amino acid sequences.

DNA sequence processing, identification of ORFs, deduced amino acid sequence identification, and location of hydrophobic regions (Kyte and Doolittle 1982) with a window of 11 amino acids) were performed with the GeneWorks package (release 2.4; IntelliGenetics, Mountain View, CA). The PSORT program was also used to detect hydrophobic regions. Localization of promoter regions was obtained from a remote search with the Promoter Prediction for Neural Networks program (Reese et al. 1996). Similarities between sequences were obtained from a remote search at NCBI data bases with the BLAST program (Altschul et al. 1990). Figure 2 was obtained with the Publish program; percentage of identity and similarity among sequences was calculated by the BioEdit program; multiple sequence alignments were obtained by the PileUp program and displayed with the Pretty program. These programs are from the Wisconsin Package version 8.1 (Genetics Computer Group, Madison, WI).

Localization of the *Tn5* insertion in strain CE168.

The 1550 specific primer 5'-GCACGATGAAGACAGA AGTT-3' (lower) designed from bases 118 to 98, the 5'-GCCGATGTTCAOITOTTCOG-3' covering bases 2104 to 2084 of *lpsB2* (upper) primer (Fig. 2), and genomic DNA from the LPS-deficient CE168 strain were PCR amplified from which we determined the DNA sequence of the corresponding right *Tn5-lpsB* DNA junction. The same 1550 specific primer (upper) was used together with the 5'-CGACGAATGTGATGGGTG-3' (lower) primer extending from bases 1628 to 1645, to obtain the PCR product, from which we determined the DNA sequence of the corresponding left *Tn5-lpsB* DNA junction. Both reactions were carried out with the GeneAmp PCR reagent kit (Perkin Elmer, Branchburg, NJ).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Laura Cervantes for technical help, to Patricia Bentes for technical assistance with the automatic sequencer, and to Jean-Marie and Marie-Louise Tschirg for their contribution to sequence analysis. We thank Miss Trina and Dale Neal for sharing unpublished data with us. Also, we thank Lourdes Girard for helpful discussions, and Patrice Dams, Rafael Pelaez, Dale Noel, and David Rose for reviewing the manuscript. This work was partially supported by grant no. IN308093 from DGAPA-UNAM.

LITERATURE CITED

Allaway, D., Jayaraman, B., Carlson, R. W., and Poole, P. S. 1996. Genetic and chemical characterization of a mutant that disrupts synthesis of the lipopolysaccharide core tetrasaccharide in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 178:6403-6406.

Allott, A., and Mendelsohn, J. 1996. Identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* 19:37-52.

Altshuler, S. P., Clubb, W., Miller, W., Myron, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Beck von Rodman, S., McCutchan, J. E., and Farrant, S. K. 1989. Characterization of conjugative plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* T1 plasmid pTIC28. *J. Bacteriol.* 171:5281-5289.

Borkhar, D., Barker, R. F., Leachford, J. W., Rossen, L., and Johnson, A. W. 1984. Analysis of gene products of *Rhizobium leguminosarum* required for exopolysaccharide synthesis and nodulation of pea. Their primary structure and their interaction with psi and other nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 245:161-165.

Boyer, H. W., and Roulland-Dubois, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:569-672.

Breedveld, M. W., Caster-Cremers, H. C. J., Batley, M., Posthumus, M. A., Zevenhuizen, L. P. T. M., Wijffelman, C. A., and Zehnder, A. J. B. 1993. Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 173:750-757.

Brink, B. A., Miller, J., Carlson, R. W., and Noel, K. D. 1990. Expression of *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genes for lipopolysaccharide in strains derived from different *leguminosarum* soil isolates. *J. Bacteriol.* 172:548-555.

Brom, S., García-de los Santos, A., Stropkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., and Palacios, R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174:5183-5189.

Brom, S., Martínez, E., Dávila, G., and Palacios, R. 1988. Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1280-1283.

Buendia, A. M., Erenkel, B., Kopolin, R., Niehaus, K., Arnold, W., and Puhler, A. 1991. The *Rhizobium meliloti* *exoZ*203 fragment of megaplasmid 2: *ExoZ* functions as a UDP-glucose 4-epimerase and *ExoZ* shows homology to *NeoX* of *Rhizobium leguminosarum* biovar *strain* TMO. *Mol. Microbiol.* 3:1519-1530.

Burrows, L. L., and Chesser, J. 1996. Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. *Mol. Microbiol.* 22:481-495.

Caster-Cremers, H. C. J., de Vries, A. P., Evidente, L., Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P. T. M., Pees, E., Wijffelman, C. A., and Lugtenberg, B. J. J. 1990. *Rhizobium leguminosarum* *exoS9* mutants are deficient in synthesis of UDP-glucose 4-epimerase. *J. Biol. Chem.* 265:21122-21127.

Carlson, R. W., Cabel, F., Noel, K. D., and Hollingsworth, R. 1989. The structure of the lipopolysaccharide core tetrasaccharide from *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CE3 and two of its symbiotic mutants, CE109 and CE309. *Carbohydr. Res.* 195:101-110.

Carlson, R. W., Kalerud, R., Tarowicki, D., Fackton, J., and Noel, K. D. 1987. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *J. Bacteriol.* 169:4921-4928.

Carlson, R. W., Reusch, B., Chen, T., Bath, U. R., and Noel, K. D. 1995. Lipopolysaccharide core structure in *Rhizobium* spp. and mutants deficient in O-acetylation. *J. Biol. Chem.* 270:229-242.

Chand, P., Boucher, C., Juliot, J. S., Michel, M., and Denarié, J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using repetitive *pel* A-sequences. *J. Bacteriol.* 113:229-242.

Cava, J. R., Elias, P. M., Tarowicki, D. A., and Noel, K. D. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN942 genetic region encoding lipopolysaccharide structure essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* 171:1-13.

Cava, J. R., Tao, H., and Noel, K. D. 1990. Mapping of complementation groups within *Rhizobium* CFN942 genetic region: a 1.5 kb region required for lipopolysaccharide synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 221:123-128.

Cooper, D. L., and Cook, D. 1990. Molecular genetics of extracellular

polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:271-279.

Crow, V. L., Jarvis, B. D. W., and Greenwood, R. M. 1981. Deoxyribosaccharide mutants among acid-producing strains of *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:152-172.

Deshdel, R., and Noel, K. D. 1989. *Rhizobium leguminosarum* symbiotic nodulation mutants: biochemical analysis and symbiotic behavior on three hosts. *J. Bacteriol.* 171:4821-4830.

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribosaccharide acid bacteria. *J. Bacteriol.* 134:84-89.

Fahnestock, G. 1957. The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16:374-383.

Figurski, D. H., and Helinski, D. R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1452-1455.

Flores, M., González, V., Brom, S., Martínez, E., Pérez, D., Romero, D., Dávila, G., and Palacios, R. 1987. Rerepeated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 169:2828-2834.

García-de los Santos, A., Brom, S., and Romero, D. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:119-125.

Graham, P. H., Vient, S. E., Mackie, F., Vargas, A. A. T., and Palacios, A. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 5:121-128.

Hoed, E. E., Helmer, G. L., Frakey, R. T., and Chilton, M. D. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTi5854 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168:1129-1301.

Hooikaas, P. J., Kispilsky, P. M., Nutt, M. F., Schlippenroth, R. A., and Borch, A. 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* T1 plasmid to avirulent *Agrobacterium* and to *Rhizobium* ex planta. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-485.

Hynes, M. F., and MacGregor, N. F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4:367-374.

Hynes, M. F., Quaid, J., O'Connell, M. P., and Puhler, A. 1989. Direct selection for the curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *actB* gene. *Gene* 78:11-20.

Jennings, M. P., Van der Ley, P., Wilks, K. E., Maskell, D. J., Poolman, J. T., and Brown, E. R. 1993. Cloning and molecular analysis of the *galE* gene of *Neisseria meningitidis* and its role in lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 10:361-369.

Jiang, X. M., Hsiao, B., Santigro, F., Lee, S. J., Romans, L. K., and Reeves, P. R. 1991. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2). *Mol. Microbiol.* 5:995-1013.

Jones, D. G., and Gutierrez, N. 1987. An efficient mobilizable cosmid vector, pRK7813, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens* strain W376a. *Gene* 61:299-306.

Kowalski, E., Skorzupka, A., and Larkiewicz, Z. 1981. Transfer of nodulation ability in *Rhizobium* using a R68.43 derived plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 183:381-391.

Kyle, J. A., and Lee, C. R. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.

Leight, J. A., and Lee, C. R. 1948. Characterization of lipopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* from infection nodules. *J. Bacteriol.* 170:3327-3332.

Leight, J. A., and Walker, C. C. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: Synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Plant Sci.* 6:63-67.

López-Lara, I. M., Orgambide, O., Dazzo, F. B., Olivares, J., and Toro, N. 1995. Surface polysaccharide mutants of *Rhizobium* sp. (Acacia) nodules: *rfb* gene requirement for lipopolysaccharide for successful invasion of Acacia nodules and host range determination. *Microbiology* 141:573-581.

Macgregor, N. F., Manning, P. A., and Morona, R. 1994. Characterization of the GTP-dependent biosynthetic genes encoded in the *rfb* locus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 11:281-292.

Martínez, E., and Palacios, R. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169:2828-2834.

Martínez, E., Flores, M., Palacios, R., and Corvalán, M. A. 1985. Reformation of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation seed nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 133:179-178.

- Martinez-Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil* 161:11-20.
- Merade, H.-M., Long, S. R., Ruvkun, C. B., Brown, S. E., and Ausubel, F. M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and autotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149:114-122.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Morales, V. M., Backman, A., and Bagdarian, M. 1991. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* 99:139-142.
- Müller, P., Keller, M., Weng, W. M., Quandt, J., Arnold, W., and Pühler, A. 1993. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *nodYQ* operon: *nodY* is homologous to yeast transferase and *nodQ* encodes a transmembrane protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:35-65.
- Nishiguchi, R., Takahashi, M., and Oka, A. 1987. Characterization and sequence determination of the replicator region in the heavy-metal-inducing plasmid pR1A4b. *Mol. Gen. Genet.* 206:1-8.
- Noel, K. D. 1992. Rhizobial polysaccharides required in symbiosis with legumes. Pages 324-357 in: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. D. P. S. Verma, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Noel, K. D., Sanchez, A., Fernandez, L., Laumann, J., and Cavallo, M. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- Ooms, G., Hooftkaas, P. J. J., Van Venn, R. J. M., Van Beelen, P., Regenborght, T., and Schilperoord, R. A. 1982. Centipede T1 plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7:15-19.
- Piero, D., Natividade, E., and Selander, R. K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Bailado, T., Sorberón, C., and Palacios, R. 1982. Retention of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299:724-728.
- Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Rhodes, C., and Berg, P. 1976. Labeling deoxyribonucleic acid in high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase α . *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
- Rose, M. G., Heston, N. L., and Ames, E. H. 1989. Large scale sequencing specific neural networks for promoter and splice site recognition. Pages XXXIX in: Proc. Pacific Symp. Biocomput. Larry Hunter and Terri Klein, eds. PUBLISHER IN COOPERATION.
- Rosenberg, C., and Hughes, T. 1984. The pATC8 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol. Gen. Genet.* 196:533-536.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. A. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sau, S., and Lee, C. Y. 1996. Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178:2118-2126.
- Scheltzer, M., Kondorosi, E., Rast, F., Buit, M., and Kondorosi, A. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium* plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* 156:1-75.
- Segovia, L., Young, J. P. W., and Martinez-Romero, E. 1993. Reidentification of American *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:74-377.
- Shank, M., Vanho, B., Toussens, P., and Al-Needy, A. 1992. A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 17:575-584.
- Soto, M. J., Zorzan, A., Garcia-Rodriguez, P. M., Mercedo-Blanco, J., López-Lara, I. M., Olivares, J., and Toro, N. 1994. Identification of a novel *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency *nod* gene homolog of *Agrobacterium* contains three cyclodextrinase. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:703-707.
- Stephens, T., Brown, S., Garcia-de los Santos, A., Girard, L., Dittels, G., and Palacios, R. 1993. Plasmid related phenotype of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843. Page 633 in: New Horizons in Nitrogen Fixation. R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton, eds. *Plenum Acad. Pub.*, Dordrecht, The Netherlands.
- Turner, S. L., and Young, J. P. 1995. The *nod* genes of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRLJ1. *PEMS Microbiol. Lett.* 133:33-36.
- Weng, S., and Gabriel, O. 1969. Biological mechanism involved in the formation of deoxy sugars. *J. Biol. Chem.* 244:3430-3437.
- Wesson, R. J. 1992. Analysis of the C_4 -dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*. *Molecular Signaling and Deduced Products of *atxA*, *atxB*, and *atxD**. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:174-181.
- Wessonga, R. K., Torgerson, P., and Holt, W. G. J. 1986. Production of the succinyls of the ADP-binding site in proteinase, using an amino acid impurity. *Bioprocess. J. Mol. Biol.* 167:101-107.
- Wyle, P., and Reeves, P. 1989. Identification and sequence of the gene for *Shigella sonnei*, which confers antigenic specificity on group B *Salmonella*: Homology with galactose epimerase. *J. Bacteriol.* 171: 5667-5693.
- Zacharias, L. P. T. M., and Van Nieuwen, A. R. W. 1983. Gal-forming capsular polysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Carbohydr. Res.* 124:166-171.

1995
 + Paper: 737-738 Pacific Symposium on
 Biocomputing '96. L. Hunter and
 T. Klein, eds. World Scientific
 Publishing Co., Singapore.

**MP08 0944T.P1 Garcia-de los Santos and Brown,
gallery 1**

Table 2. Identity and similarity of ORF1, LpsB1, and LpsB2 with homologous proteins*

ORFs (Length) ^b	Similar polypeptides	Length ^b	Degree of identity/similarity	Potential functions	Data base accession number
ORF1 (173)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> RepC	403	60.8/74.1	Plasmid replication	X19447
	<i>A. rhizogenes</i> RepC	408	60.5/73.4	Plasmid replication	X104833
LpsB1 (193)	<i>Shigella flexneri</i> Cap5M	185	43.4/66.8	Undetermined	U81973
	<i>S. aureus</i> Cap5M	185	42.8/66.8	Undetermined	U73374
	<i>Campylobacter jejuni</i> RfBP	200	39.0/63.1	Galactosyltransferase	X91101
	<i>R. leguminosarum</i> Pta2	200	38.8/61.3	Undetermined	P10498
	<i>R. solanaceae</i> EcoY	226	37.8/60.9	Galactosyltransferase	G02731
	<i>Salmonella anatum</i> RfBP	125	37.8/60.5	Galactosyltransferase	X160666
	<i>Vibrio cholerae</i> Orf7	186	36.9/53.9	Galactosyltransferase	U47037
	<i>Anabaena</i> RfBP	232	33.1/56.8	Galactosyltransferase	U75690
	<i>Salmonella typhimurium</i> RfBP	676	31.8/52.1	Galactosyltransferase	S15314
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> GumD	484	31.4/54.7	Glycosyltransferase	U32511
LpsB2 (683)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WbpM	663	51.0/69.0	Egimerase/aldohydrolase	U50396
	<i>Bordetella pertussis</i> BpL1	624	45.5/64.8	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	X90711
	<i>Yersinia enterocolitica</i> TraC	636	45.1/66.2	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Z47767
	<i>S. aureus</i> CapD	599	38.0/63.6	Undetermined	U10927
	<i>V. cholerae</i> ORF11	378	54.1/69.8	Undetermined	U47057
	<i>Neisseria meningitidis</i> GalE	339	22.7/48.0	UDP-glucose 4-epimerase	L09188
	<i>N. meningitidis</i> RfB	360	22.0/46.0	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	L09188
	<i>R. solanaceae</i> EcoB	328	21.8/45.0	UDP-glucose 4-epimerase	P26503
	<i>N. gonorrhoeae</i> RfB	346	21.0/46.5	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	P37761

* Values are in percentage (see Materials and Methods).

^b Amino acids.

MPMI 0244T.P1 Garcia-de los Santos and Strom,
 galaxy 2

Microbiology 75 (1987) 3

Table 2. Strains and plasmids used in this study

Strain	Source	Relevant characteristics	Reference or source*
<i>Rhizobium etli</i>			
CPN42	(+)	Wild type	Quinto et al. 1982
CE168	(-)	CPN42 (p)g::Tn5, Lys ⁻ , Ndv ⁻	Cava et al. 1989
CPN183	(-)	CPN42 cured of pCPN42b	Bron et al. 1992
CPN188	(+)	CPN183 harboring pDEL27	Bron et al. 1992
CPN190	(+)	CPN183 harboring <i>R. etli</i> CPN42 plasmid pCPN42b::Tn5mob	Bron et al. 1992
CPN230	(-)	CPN183 Rif ^r	This study
CPN227	(-)	CPN42 harboring <i>A. tumefaciens</i> NT-1 plasmid pTICS8Tm ⁺ ::Tn5J7-52, Km ^r	This study
CPN228	(+)	CPN183 harboring <i>A. tumefaciens</i> NT-1 plasmid pTICS8Tm ⁺ ::Tn5J7-52, Km ^r	This study
CPN229	(+)	CPN228 complemented with pDEL27, Tc ^r	This study
CPN231	(+)	CPN230 complemented with <i>R. etli</i> plasmid pTAL182a::Tn5mob- <i>sec</i>	This study
CPN232	(+)	CPN230 complemented with <i>R. etli</i> plasmid pViking B::Tn5mob- <i>sec</i>	This study
CPN233	(+)	CPN230 complemented with <i>R. leguminosarum</i> plasmid pANU43b::Tn5mob- <i>sec</i>	This study
CPN230	(+)	CPN230 complemented with <i>R. leguminosarum</i> plasmid pVlVF39c::Tn5mob-Sp	This study
CPN230	(+)	CPN230 complemented with pAGS10	This study
CPN235	(+)	Wild type	Piñero et al. 1988
Brazil 5	(+)	Wild type	Martinez et al. 1985
CPN285	(+)	Wild type	Piñero et al. 1988
Nitrogen fixers			
Nitro in 8251	(+)	Wild type	Piñero et al. 1988
TAL 182	(+)	pTAL 182a::Tn5mob- <i>sec</i>	This study
TAL 182-1	(-)	TAL 182 cured of plasmid pTAL182a	This study
TAL 182-2	(+)	TAL 182-2 complemented with <i>R. etli</i> plasmid pCPN42b::Tn5mob	This study
TAL 182-3	(+)	TAL 182-2 complemented with <i>R. leguminosarum</i> plasmid pVlVF39c::Tn5mob-Sp	This study
Viking 1	(+)	Wild type	Piñero et al. 1988
Viking 1-1	(+)	pVikingb::Tn5mob- <i>sec</i>	This study
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
NT-1	(-)	<i>A. tumefaciens</i> NT-1 harboring plasmid pTICS8Tm ⁺ ::Tn5J7-52, Km ^r	Beck von Bodman et al. 1989
GM19023-1	(-)	<i>A. tumefaciens</i> GM19023 harboring plasmid pTICS8Tm ⁺ ::Tn5J7-52	This study
C-58	(-)	Vir ⁻ wild-type neoplas strain	Rosenberg and Hughes 1984
GM19023	(-)	C-58 cured of its native plasmids	Rosenberg and Hughes 1984
LBA 4404	(-)	Vir ⁻	Coma et al. 1982
IEHA 101	(-)	Vir ⁻ wild type	Hood et al. 1986
<i>Leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>			
ANU83	(+)	Wild type	B. G. Rolfe
ANU83-1	(+)	pANU83b::Tn5mob- <i>sec</i>	Stenkowski et al. 1993
ANU83-2	(+)	Cured of plasmid pANU83b Rif ^r	Stenkowski et al. 1993
ANU83-3	(+)	ANU83-2 Rif ^r complemented with <i>R. etli</i> plasmid pCPN42b::Tn5mob	This study
ANU83-4	(+)	ANU83-2 Rif ^r complemented with <i>R. etli</i> plasmid pTAL 182a::Tn5mob- <i>sec</i>	This study
ANU83-5	(+)	ANU83-2 Rif ^r complemented with <i>R. leguminosarum</i> plasmid pVlVF39c::Tn5mob-Sp	This study
TAL	(+)	Wild type	B. G. Rolfe
24	(+)	Wild type	Kowalczyk et al. 1981
USDA1596	(+)	Wild type	USDA
USDA2134	(+)	Wild type	USDA
USDA2152	(+)	Wild type	USDA
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>			
VF39	(+)	Wild type	Hynes and MacGregor 1990
VF39-1	(+)	pVlVF39c::Tn5mob-Sp (RP4-4)	M. F. Hynes
LR339301	(-)	VF39 cured of plasmid VF39c	Hynes and MacGregor 1990
B-10	(+)	Wild type	W. Loiz
RBL1302	(+)	Wild type	C. A. Wijnfelman
<i>R. meliloti</i>			
2011	(-)	Wild type	Caasé et al. 1979
1021	(-)	Wild type	Meadé et al. 1982
M119	(-)	Wild type	CIPN
cc169	(-)	Wild type	CIPN
311	(-)	Wild type	CIPN
<i>R. tropici</i> HA			
CPN 259	(-)	Wild type	Martinez et al. 1987
BR 829	(-)	Wild type	CNPBS
BR 10037	(-)	Wild type	CNPBS
<i>R. tropici</i> HB			
CIAT 899	(-)	Wild type	Graham et al. 1982
BR 848	(-)	Wild type	CNPBS
BR 850	(-)	Wild type	CNPBS
BR 852	(-)	Wild type	CNPBS

MP901 0244T.P1 García-de los Santos and Brown,
galaxy 3

<i>R. loti</i>				
KCF2037	(-)	Wild type		Cover et al. 1981
<i>R. fredii</i>				
USDA 191	(-)	Wild type		USDA
<i>Rhizobium spp.</i>				
NGR134	(-)	Wild type		B. G. Smith
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>				
USDA 110	(-)	Wild type		USDA
USDA370	(-)	Wild type		USDA
USDA3341	(-)	Wild type		USDA
<i>Azorhizobium caulinodanum</i>				
OR5571	(-)	Wild type		K. Chisholm
<i>Plasmids</i>				
pM127		7.5-kb EcoRI fragment containing the <i>lypB</i> region cloned in pLAFR1.Tc ^a		Cava et al. 1989
PAQ510		3.6-kb EcoRI-BamHI fragment of pDEL27 cloned in pRK7813.Tc ^a		This study
PAQ54		0.718-kb XhoI-BamHI fragment of pAQ510 cloned in pBluescript II SK ⁺ . Cb ^b		This study
PAQ511		3.2-kb EcoRI-BamHI fragment of pAQ510 cloned in pRK7813		This study
PAQ513		PAQ510 deleted of XhoI-XhoI 0.715-kb fragment		This study
PAQ515		4.3-kb SalI-SalI fragment of pDEL27 cloned in pM1306.Cm ^c		This study
pM130206		Broad-host-range plasmid vector, IncQ, <i>Pseudomonas</i> IncZ ₆ . Cm ^c		Montoya et al. 1991
pRK7813		Broad-host-range cosmid vector, Mob, IncP, Tc ^c		Jones and Cameron 1987

^a Sources: B. G. Rolfe, Plant-Microbe Interaction Group, Australian National University, Canberra; USDA, Beltsville *Rhizobium* Culture Collection, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD; M. F. Hynes, Soil Science Section, Agriculture Canada Research Station, Lethbridge, Alberta, Canada; W. Lott, Institute für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg, Stauferstrasse 5, D-8520 Erlangen, Germany; C. A. Wijffelman, Department of Plant Molecular Biology, Leiden University, Nieuwsteeg 3, 2311 VJ Leiden, The Netherlands; CENP, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México; CNPq/RS, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo, Seropédica 23851, Rio de Janeiro, Brazil; K. Chisholm, Laboratorium Genetika, Universiteit Gent, Ledeganckstraat 35 B-9000 Ghent, Belgium. Total DNA from these strains was probed against *R. loti* *lypB* region, strains in which homologous sequences to *R. loti* *lypB* were found (+), strains that presented no hybridization signal (-).

^b Abbreviations: Lys, lipopolysaccharide; Nod, nodule development; Km, kanamycin; Tc, tetracycline; Rif, rifampicin; Sp, spectinomycin; Cb, carbenicillin; Cm, chloramphenicol.

Table 3. Free-living and symbiotic phenotypes of *Rhizobium loti* and *R. leguminosarum* cross-complemented strains

Strain	Relevant genotype	Phenotypes			
		Fluorescence ^a	Me- al. My ^b	Nod- ulation	N ₂ fixation
<i>R. loti</i>					
CFN42	Wild type	-	+	+	+ ^d
CFNX230	pb ⁻ Rif ^r	-	+	-	+ ^d
CFNX231	pb ⁻ Rif ^r /pTAL182a	-	+	-	+ ^d
CFNX232	pb ⁻ Rif ^r /pViking1b	-	+	-	+ ^d
CFNX233	pb ⁻ Rif ^r /pANU843b	-	+	-	+ ^d
CFNX234	pb ⁻ Rif ^r /pVF39c	-	+	-	+ ^d
TAL182	Wild type	-	+	+	+ ^d
TAL182-2	pc ⁻ 3p ⁻	-	+	-	+ ^d
TAL182-3	pc ⁻ Rif ^r /CFN42b	-	+	-	+ ^d
TAL182-4	pc ⁻ 3p ⁻ /pVF39c	-	+	-	+ ^d
<i>R. leguminosarum</i>					
ANU843	Wild type	-	+	+	+ ^d
ANU843-2	pb ⁻ Rif ^r	-	+	-	+ ^d
ANU843-3	pb ⁻ Rif ^r /pCFN42b	-	+	-	+ ^d
ANU843-4	pb ⁻ Rif ^r /pTAL182a	-	+	-	+ ^d
ANU843-5	pb ⁻ Rif ^r /pVF39c	-	+	-	+ ^d

^a Checked in liquid FY medium (REFERENCE). *Loti* et al. 1974

^b Checked in FY with 0.3% agar.

^c Mutated by acetylene reduction.

^d Measured by plant dry weight.

**MP021 00447.P1 Carcinogenicity Studies and Brown,
page 4**

Table 4. Tumor induction by derivatives of *Rhizobium celi*/CP942 harboring the T₁ plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* NT1

Strain	Relevant characteristics	Tumor induction*
A. Inoculations		
NT1	Source of pT ₁ C58Tm ^a	++
GD88823-1	pT ₁ C58Tm ^a derived by CP942	++
B. cell		
CP942	Wild type	-
CP942237	CP942/pT ₁ C58Tm ^a	+
CP942183	pb ⁻ (pmt ⁻)	-
CP942236	pb ⁻ (pmt ⁻)/pT ₁ C58Tm ^a	-
CP942188	pb ⁻ (pDBL27) (pmt ⁻)	-
CP942238	pb ⁻ (pDBL27) (pmt ⁻)/pT ₁ C58Tm ^a	+

* Evaluated on *Zinnia* cells, 3 weeks after inoculation: ++, large tumors; +, medium size tumors; -, no tumors.

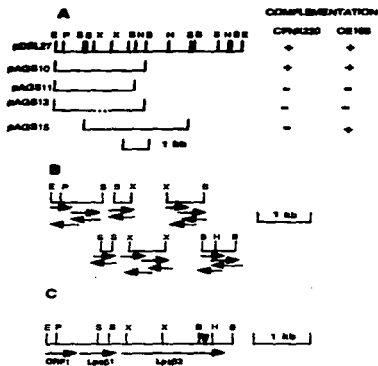


Fig. 1. Physical map and complementation analysis of *CFN42* (*lpsB*). **A**, Restriction map of the 7.5-kb *EcoRI* fragment of cosmid pDEL27. Subclones introduced by conjugation into CE168 and CFN4230 *LPS*⁻ *adv*⁻ strains are shown below restriction map. In pAGS13, a deletion of the 715-bp *XhoI-XhoI* fragment is indicated by a dotted line. Transconjugants were checked for complementation of flocculation, nodulation, and nitrogen fixation phenotypes. **B**, Subclones used for DNA sequencing of the 3.995-kb *EcoRI-BamHI* fragment. **C**, Deduced ORF1, LpsB1, and LpsB2 are indicated below the pAGS10 subclone. Location of the *Tn5* insertion in strain CE168 is indicated by arrowhead. Abbreviations: E, *EcoRI*; P, *PstI*; S, *SacI*; X, *XhoI*; H, *HindIII*. Symbols: +, complementing subclone; -, non-complementing subclone.


```

SRFBP .....mshln hysqkclif lalnllfn lnlwlgcv flimqqr7 lpsqjdrv 54
XcGnd mllnlms tytmqpl mlymnaavl LvVLDLmrv nqglarylv Pysqmqqr7 rvalatly 69
Consensus -----L---H---V-----
          * *

SRFBP lshllawc wpsvmlah ysyrqyve lshlrtriv faldlala flmqlmrv wvfwfali 136
XcGnd wvialafpl ymqlqgll nqlwlgqv qvvalfnh alwqmqqr arqqlmrv qglawlar 139
Consensus -----R-----V--I-----M---V-----A--
          * * * *

SRFBP lqpfmrlk hllmqlqth kklilqngv naryqyql nmlqqlrvi afvklmsh nlmqLVND 194
XcGnd cilqylmli rtpqyqqr wvqlrqpq hshlylrqv wqlmqrqyf rtpqlmsh qvqLPLQD 209
Consensus -----S---R---S---A-----L---P---D
          * * * *

SRFBP klshlark qhlylqps yvalatrhv kvshlshv rrvwvrvv lqqlrdrw lshmlsh 266
XcGnd qhshlylm wqlmqlsh plqshlshq lqqlrdrp wshlmlsh PLVlqngv lqqlrdrw 279
Psdxyf .....mh shrvns.....lqr lqqlrdrw 22
Consensus -----V-----L---W---P 1-5-10-12
          * * * *

SRFBP lqnlmshv rvlmrvv qvmlmlsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 335
XcGnd qvshlshq PLVlrvv lqqlrdrw PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 349
Psdxyf plqqlrdrw PLVlrvv qvmlmlsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 35
Rlpsr2 .....VLAH-GDP wshlmlsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 42
Rlpsr1 .....mqlwlyt PLVlrvv lqqlrdrw PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 64
Consensus --G-M-S- VLA-A-PDL LA-LALLLS PLVlrvv-A-LV lqqlrdrw-V --MQLWLYT -PE-YEYEN
          * * * *

SRFBP wvqyqlsh lshmlshv shshlshv shv. lrvsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 603
XcGnd shshlshq .....lqqlrdrw shv. lrvsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 602
Psdxyf wshlmlsh PLVlrvv shshlshq shv. lrvsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 153
Rlpsr2 PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq shv. lrvsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 135
Lpsl1 shshlshq .....lshmlsh shshlshq PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw 120
Consensus WVD-SHSLV -----P-A-- M--QLWLYT shv. lrvsh PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq lqqlrdrw
          * * * *

SRFBP .....vshlshq rvlmrvv shv. nqlwlyt qvshlshq .....wshlshq wshlshq PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 661
XcGnd shv.....qsh wshlshq shshlshq shshlshq wshlshq wshlshq PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 669
Psdxyf .....vshlshq lqqlrdrw shv. nqlwlyt qvshlshq .....wshlshq wshlshq PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 211
Rlpsr2 shshlshq lqqlrdrw shshlshq shshlshq shshlshq wshlshq PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 195
Lpsl1 wshlshq wshlshq .....shshlshq shshlshq shv. nqlwlyt qvshlshq PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 177
Consensus sh---sh- lrv-lv-H. shv---vq-T shshlshq shv. nqlwlyt qvshlshq PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq
          * * * *

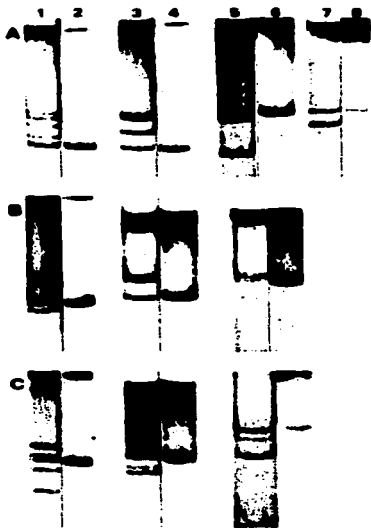
SRFBP PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 474
Dxyf PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 484
XcGnd PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 234
Rlpsr2 PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 200
Lpsl1 PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq 193
Consensus PLVlrvv r. nqlwlyt qvshlshq

```

Fig. 3. Alignment of the deduced amino acid sequences of Rlpsr1 and Lpsl1 (indicated by asterisks) and conserved residues from *Schistosoma japonicum* RFBP, *Xenopus laevis* RFBP, *R. rattus* RFBP, *R. leprosus* RFBP, *R. leprosus* RFBP, *R. leprosus* RFBP, *R. leprosus* RFBP. Amino acid residues identical in all five proteins are indicated by asterisks. Highly conserved hydrophobic regions among all of these proteins are boxed.

Leu1	54
Leu2	57
Leu3	58
Leu4	59
Leu5	60
Leu6	61
Leu7	62
Leu8	63
Leu9	64
Leu10	65
Leu11	66
Leu12	67
Leu13	68
Leu14	69
Leu15	70
Leu16	71
Leu17	72
Leu18	73
Leu19	74
Leu20	75
Leu21	76
Leu22	77
Leu23	78
Leu24	79
Leu25	80
Leu26	81
Leu27	82
Leu28	83
Leu29	84
Leu30	85
Leu31	86
Leu32	87
Leu33	88
Leu34	89
Leu35	90
Leu36	91
Leu37	92
Leu38	93
Leu39	94
Leu40	95
Leu41	96
Leu42	97
Leu43	98
Leu44	99
Leu45	100
Leu46	101
Leu47	102
Leu48	103
Leu49	104
Leu50	105
Leu51	106
Leu52	107
Leu53	108
Leu54	109
Leu55	110
Leu56	111
Leu57	112
Leu58	113
Leu59	114
Leu60	115
Leu61	116
Leu62	117
Leu63	118
Leu64	119
Leu65	120
Leu66	121
Leu67	122
Leu68	123
Leu69	124
Leu70	125
Leu71	126
Leu72	127
Leu73	128
Leu74	129
Leu75	130
Leu76	131
Leu77	132
Leu78	133
Leu79	134
Leu80	135
Leu81	136
Leu82	137
Leu83	138
Leu84	139
Leu85	140
Leu86	141
Leu87	142
Leu88	143
Leu89	144
Leu90	145
Leu91	146
Leu92	147
Leu93	148
Leu94	149
Leu95	150
Leu96	151
Leu97	152
Leu98	153
Leu99	154
Leu100	155

Fig. 4. Comparison of the deduced amino acid sequences of *Blattella* and *Leptis* with *Prodenia ornithogalli* *Wright*. Identical positions *Bgl*, *Trachea concolorata* *Full.*, *B. scabra* *Full.*, *Blattella ornithogalli* *Wright*, and *B. germanica* *Full.* identified as conserved residues are in uppercase. Conserved domain residues that are conserved in at least 90% of the sequences, residues conserved among *Leptis*, *Wright*, *Bgl*, and *Trachea* are in bold. Hydrophobic regions strongly conserved in the N terminus of *Leptis*, *Wright*, *Bgl*, and *Trachea* are indicated. The positive NAD-binding domain is in a box; residues identical to the consensus NAD-binding domain (Wang et al. 1990) are indicated by an asterisk; amino acids clearly conserved for the *Bgl* field; residues identical to NAD-dependent proteins are in bold in all cases sequences.



M02443.tif

Fig. 2. Sequences homologous to *Rhizobium etli* CFN42 (*pep*) region located in plasmids of *R. etli*, *R. leguminosarum* by: *trifolii*, and *R. leguminosarum* by: *vicia sativa*. Over-exposed lanes are ethidium bromide-stained plasmid profiles. Even-numbered lanes are Southern blots of each plasmid profile probed with *R. etli* CFN42 (*pep*) and *pep2* internal fragments. A, *R. etli* strains: 1, 2 CFN42 (ps, 150 kb); 3, 4 TAL182 (ps, 150 kb); 5, 6 CFN 285 (ps, 600 kb); 7, 8 Viking 1 (ps, 600 kb). B, *R. leguminosarum* by: *trifolii* strains: 1, 2 AMUS43 (ps, 230 kb); 3, 4 USDA 1596 (ps, 230 kb); 5, 6 TA1 (ps, 500 kb). C, *R. leguminosarum* by: *vicia sativa*: 1, 2 VF39 (ps, 400 kb); 3, 4 BLL1362 (ps, 600 kb); 5, 6 B10 (ps, 500 kb).

RESULTADOS ADICIONALES.

INFORMACION ADICIONAL SOBRE EL ORF1 INCOMPLETO.

Como se mencionó en los resultados del artículo, el análisis de secuencia de ADN del fragmento *EcoRI-BamHI* (3595 pb) clonado en el plásmido pAGS10, reveló la presencia de un ORF incompleto (ORF1), corriente arriba del gene *lpsB1*.

La comparación de la secuencia de aminoácidos del ORF1, con la base de datos de proteínas contenida en el NCBI, indicó que los 173 aminoácidos del ORF1 tienen un alto nivel de similitud con el extremo carboxilo de proteínas RepC de diferentes bacterias. Como se puede observar en la Tabla 2, el mayor porcentaje de identidad y similitud fue con el extremo carboxilo de las proteínas RepC de los plásmidos pCFN42d (pSim) de *R. etli*, pRLB11 de *R. leguminosarum* y pRiA4b de *A. rhizogenes*.

En las especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium* donde se ha estudiado esta proteína, RepC generalmente se encuentra codificada en una región genética conocida como replicador, formando el operon *repABC*. El producto de los tres genes interviene en el proceso de replicación de los plásmidos (Tabata *et al.* 1989)

En la fig. 4, se muestra el alineamiento de la secuencia parcial de aminoácidos del ORF1, con el extremo carboxilo de las diferentes proteínas RepC reportadas en la Tabla 2.

La mayor divergencia entre los extremos carboxilos de las siete proteínas RepC comparadas se encuentra contenida entre los aminoácidos 23 y 48 (ver fig. 4). En esa zona, el ORF1 de *R. etli* y la proteína RepC de *R. meliloti* contienen 25 aminoácidos de los cuales únicamente seis están conservados entre ambas secuencias. Las proteínas RepC de *R. etli* (pSim), *R. leguminosarum*, *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*, carecen de esta secuencia de aminoácidos.

OTRAS SECUENCIAS DEL pCFN42b CONSERVADAS EN EL GENOMA DE *R. leguminosarum* bv. trifolii ANUS43 Y *R. leguminosarum* bv. viciae VF39.

Como se mencionó en los resultados del artículo, la región *lpsB*, está conservada en los plásmidos de *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. viciae y trifolii (Fig 4, artículo). Asimismo, la homología funcional de esta región se demostró para los plásmidos pCFN42b, pANUS43b y pVF39c (Tabla 2, artículo).

Con la finalidad de conocer si entre estos tres plásmidos, además de la región *lpsB*, existen otras secuencias de DNA conservadas, llevamos a cabo hibridaciones tipo Southern utilizando como sonda el pCFN42b completo.

Al igual que en hibridaciones anteriores (ver artículo), estas también fueron realizadas en condiciones de alta severidad, con lo cual solo secuencias altamente homólogas pueden ser detectadas.

En este experimento patrones de genoma total de las cepas silvestres y sus respectivas derivadas curadas, se hibridaron con este detector. En la fig. 5 se puede apreciar claramente múltiples señales de hibridación en los patrones silvestres y no en los de las derivadas curadas. Considerando las bandas de hibridación como fragmentos únicos, se estimó que alrededor de 65 kb de DNA del pANUS43b mostraron homología con pCFN42b, es decir el 43% del pCFN42b. Para el caso de pVF39c, el cálculo indica que aproximadamente, 112 kb de DNA, mostraron homología con secuencias del pCFN42b, lo cual representa el 74% de éste último.

Con la finalidad de hacer más específico el análisis de las secuencias compartidas entre los tres plásmidos, utilizamos como sondas de hibridación, dos secuencias de pCFN42b clonadas y caracterizadas.

Una de estas sondas fué el plásmido pA31, el cual contiene un fragmento de 5.6 kb de DNA

proveniente de pCFN42b. Dentro de este fragmento se encuentran contenidos los genes *rnrA* y *rnrB* los cuales confieren resistencia a *R. etli* CFN42 contra algún(os) compuestos tóxicos presentes en el exudado de raíces de frijol (González, 1996).

Perfiles de plásmidos de las cepas silvestres de *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 y *R. leguminosarum* bv. viciae VF39, así como de sus respectivas derivadas curadas (pCFN42b-, pANU843b- y pVF39c-), se hibridaron utilizando como sonda el pA31. Como se puede observar en la fig. 6, señales de hibridación se detectaron únicamente en los patrones silvestres, lo cual indica que existen secuencias homólogas a este fragmento conservadas en los plásmidos pANU843b y pVF39c.

La siguiente sonda utilizada fue el plásmido pJMR01. Este plásmido porta un fragmento *EcoRI* de 2.7 kb del pCFN42b dentro del cual está contenido parte del gen *thiC*, necesario para la síntesis de tiamina en *R. etli* CFN42 (Miranda, 1995).

Como era de esperarse, en el caso de *R. etli* CFN42, la señal de hibridación aparece únicamente en el patrón silvestre (fig. 7). Sin embargo, en *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, se observaron secuencias homólogas tanto en la cepa silvestre (dos bandas de hibridación) como en la derivada curada (una sola banda), lo que indica que las secuencias homólogas están distribuidas en dos plásmidos: pANU843a y pANU843b.

Como se puede observar en la misma figura, en *R. leguminosarum* bv. viciae VF39, la señal de hibridación aparece también en ambos patrones (silvestre y pVF39c-). Las secuencias homólogas no se localizaron en el pVF39c, en este caso, la homología proviene de secuencias localizadas en el pVF39d.

Los datos anteriores indican que en *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 y *R. leguminosarum* bv. viciae VF39, secuencias homólogas a pCFN42b, no solo están conservadas en pANU843b y pVF39c, sino también en otros replicones.

Lo anterior se confirmó mediante otro experimento de hibridación, en el cual se utilizó como

sonda el cósmido JM1121. Este cósmido aislado a partir de un banco de genoma total de *R. etli* CFN42 por J. Miranda, lleva un fragmento de aproximadamente 23 kb (fig. 8b), dentro del cual están contenidos los genes *dhcCGE*.

En la fig. 8 se muestran las señales de hibridación sobre perfiles de plásmidos y genoma total digerido con *EcoRI*, utilizando el cósmido JM1121 como sonda. Como se puede observar, en *R. etli* CFN42 estas secuencias sólo están presentes en pCFN42b, ya que la derivada curada no mostró señales de hibridación (fig. 8a).

En *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, secuencias homólogas se localizaron no solo en el pANU843b, sino también en pANU843a, pANU843c, e incluso pudieran existir secuencias homólogas en el cromosoma, debido a lo fuerte de las señales de hibridación en la entrada de los carriles (fig. 8a). En las hibridaciones sobre genoma total, se comprueba lo anterior. Como se puede observar en la fig. 8b, con excepción de tres bandas que parecen ser específicas de pANU843b, todas las demás bandas de homología están presentes en el genoma tanto de la cepa silvestre como de la derivada curada.

Para el caso de *R. leguminosarum* bv. viciae VF39, se observa algo similar, las secuencias con mayor homología al cósmido JM1121, se localizaron principalmente en pVF39e y cromosoma, sin embargo algunas secuencias pudieran tener homología con pVF39b, y pVF39d (fig. 8a). En las hibridaciones sobre genoma total, se observa que, tanto la cepa silvestre como la derivada curada presentan casi el mismo patrón de homología (fig. 8b). Las secuencias de este cósmido con excepción de una sola banda parecen estar conservadas en replicones diferentes a pVF39c.

EXPERIMENTOS DE INCOMPATIBILIDAD DE PLÁSMIDOS.

Otra característica de los plásmidos pCFN42b, pANU843b y pVF39c se analizó mediante estudios de incompatibilidad. Para ello, los plásmidos pANU843b::Tn5mob (Km^r) y

pVF39c::Tn5mob (S^r) fueron introducidos por conjugación a la cepa silvestre de *R. etli* CFN42 (fig.9). Las transconjugantes se seleccionaron por el marcador de resistencia de cada plásmido. Las hibridaciones de los perfiles de plásmidos de las transconjugantes obtenidas, utilizando como detector la región *lpsB* (pAGS10), se muestran en la fig.9. Como se puede observar en el carril 7, la transconjugante que lleva el plásmido pANUB43b (el cual migra a la misma altura que pCFN42c) perdió su propio pCFN42b. La hibridación con el detector pAGS10, comprueba que la transconjugante solo contiene el pANUB43b. Por lo tanto ambos plásmidos son incompatibles.

El perfil de plásmidos de la transconjugante con el pVF39c, muestra la presencia del pCFN42b, así como el plásmido pVF39c, el cual migra junto con el pCFN42d (carril 9). La coexistencia de ambos plásmidos se demuestra por la doble señal de hibridación (carril 10), lo cual significa que pCFN42b y pVF39c son plásmidos compatibles.

DISCUSION Y PERSPECTIVAS

El análisis genético y molecular de los plásmidos bacterianos ha estado concentrado en busca parte en las funciones de replicación, segregación, estabilidad y transferencia. Sin embargo en la mayoría de los plásmidos, existe una cantidad de información genética adicional a la involucrada con estas funciones, la cual ha sido poco estudiada. Como ejemplo podemos mencionar el escaso conocimiento que se tiene acerca de las funciones codificadas en plásmidos, que han permitido a las bacterias colonizar exitosamente su medio ambiente natural. Las bacterias que interactúan con plantas constituyen un modelo interesante para el estudio de la información genética involucrada en la colonización de su hábitat. El estudio del pSim de *Rhizobium* y el pTi de *Agrobacterium*, han permitido entender a nivel molecular algunos de los mecanismos que participan en la relación planta-bacteria.

Además del pSim, el estudio del resto de los plásmidos de *Rhizobium*, ha ampliado el concepto que normalmente se tiene acerca de la importancia de la información genética contenida en estos replicones. Por definición los plásmidos se han considerados como elementos genéticos accesorios al cromosoma, cuya información genética sólo se utiliza ocasionalmente.

Sin embargo, los plásmidos de *Rhizobium* constituyen algo más que un reservorio de material genético importante para la colonización y adaptación al suelo y a las raíces de leguminosas. La presencia de información genética necesaria para la utilización eficiente de nutrientes, para la síntesis de tiamina y de LPS, así como las características fenotípicas observadas en las cepas curadas de múltiples plásmidos, nos hacen pensar en un fuerte compromiso de dichos replicones con el óptimo funcionamiento celular tanto en simbiosis como en vida libre.

Los datos mencionados en el presente trabajo sugieren que el metabolismo de *Rhizobium* no solo depende de la expresión de genes cromosomales, sino también de la información genética contenida en plásmidos.

Ya que la curación de plásmidos, y el análisis fenotípico de dichas mutantes no se ha llevado a cabo de manera sistemática en otros grupos de bacterias, no es fácil conocer si en plásmidos de otras bacterias existen funciones equivalentes a las observadas en *Rhizobium*.

A este respecto, únicamente sabemos que en plásmidos de *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* y *Shigella dysenteriae* también se han localizado secuencias de DNA que participan en la síntesis de lps. (Keenleyside *et al.* 1994). También en un plásmido de la cianobacteria *Anabaena azollae* se ha localizado una secuencia homóloga al gen *exoY* de *R. meliloti*, el cual codifica para una glucosiltransferasa, enzima clave en la primera etapa de síntesis de exopolisacárido (Plazinski *et al.* 1990).

En *R. etli* CFN42, la mayoría de sus plásmidos contribuyen a una fijación simbiótica de nitrógeno eficiente. La inducción e invasión de nódulos dependen de la información genética contenida en el plásmido simbiótico (pCFN42d) y de la región *lpsB* presente en el pCFN42b.

En el presente trabajo llevamos a cabo el análisis genético y molecular de la región *lpsB*, el cual contribuye de manera significativa al conocimiento sobre la síntesis de LPS. Primero, porque se demostró que de las 7.5 kb (pDel27) inicialmente utilizadas para complementar mutantes *lpsB*-, únicamente dos ORFs contenidos en una región de 2.6 kb son indispensables para síntesis de LPS, y segundo porque son los primeros datos que se aportan respecto a la posible función de las proteínas codificadas en la región *lpsB*. Mediante la búsqueda de homología con otras proteínas, nuestros datos indicaron la presencia de dos posibles enzimas claves en la síntesis de LPS.

Los datos acerca de la composición química del LPS de *R. etli* CFN42, y de una mutante de *R. trifolii* afectada en la región *lpsB* drásticamente disminuida en sus niveles de galactosa y ácido galacturónico, sugieren que el gen *lpsB1* pudiera codificar para una supuesta transferasa, involucrada en el transporte de galactosa o ácido galacturónico al oligosacárido que compone el "core".

La actividad enzimática codificada en el gen *lpsβ2* se asume a partir de la función asignada a proteínas homólogas, y a la composición química del antígeno-O. Esta enzima, pudiera ser una deshidratasa, que participe en la síntesis de alguno de los desoxi o dideoxi azúcares que se encuentren formando parte del antígeno-O. Ya que mutantes en este gene carecen de antígeno-O, creemos que el azúcar sintetizado por la proteína Lpsβ2 pudiera unir el "core" con el antígeno-O.

Para conocer la función precisa de las enzimas codificadas en la región *lpsβ*, este estudio deberá complementarse mediante un análisis de la composición química del LPS de la mutante CE168 afectada en el gen *lpsβ2* y de la cepa pCFN42b- la cual carece de ambos genes. Igualmente importante será la determinación de las supuestas actividades enzimáticas propuestas para el producto de ambos genes.

Mediante el análisis genético y fenotípico del plásmido pDel27, se demostró que la información genética localizada corriente abajo del gen *lpsβ2* no es indispensable para síntesis de LPS. Sin embargo cabe la posibilidad que alguna función importante relacionada o no con la síntesis de LPS, no detectada mediante el análisis fenotípico empleado, pudiera estar codificada en esa región. Por lo tanto será interesante continuar secuenciando en esa dirección.

Desde el punto de vista de la caracterización de secuencias codificadas en plásmidos, el análisis del fragmento de 3.6 kb clonado en el pAGS10, nos permitió identificar además de los ORFs necesarios para síntesis de LPS, 520 pb de la región 3' del posible gen *repC* (ORF1), el cual pudiera formar parte de las proteínas involucradas con la replicación de este plásmido.

En *A. tumefaciens*, RepC parece ser la principal proteína de iniciación de la replicación del plásmido T1, ya que mutaciones en el gen *repC*, provocan la pérdida de la función de replicación del plásmido. Por otro lado mutaciones en los genes *repA* o *repB* provocan una

ligera inestabilidad del plásmido (Tabata *et al.* 1989).

En el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo de las diferentes proteínas RepC, resalta una región de alrededor de 25 aminoácidos, muy poco conservada entre las seis proteínas analizadas (ver fig. 4). Turner *et al.* sugieren que la divergencia entre secuencias *repC* pudiera estar relacionada con grupos de incompatibilidad. Esta hipótesis se desprende de un estudio en el cual fragmentos de genes *repC* de diferentes miembros de la familia Rhizobiaceae, se amplificaron por PCR, se secuenciaron, y se agruparon en base al porcentaje de divergencia en la secuencia de nucleótidos (Turner *et al.* 1996). Dos plásmidos compatibles (capaces de coexistir en el mismo fondo genético) como pTIB633 de *A. tumefaciens* y pRIA4b de *A. rhizogenes*, se ubicaron en grupos muy distantes debido a su alto nivel de divergencia, probablemente el nivel de divergencia detectado es lo que ha permitido a ambos plásmidos mantener su compatibilidad. Esta hipótesis debe ser reforzada analizando la divergencia de secuencias *repC* de un mayor número de plásmidos, tanto compatibles como incompatibles.

La localización del fragmento del probable gen *repC* del pCFN42b facilitará el aislamiento y caracterización de su región replicadora. Estos datos podrían posteriormente ser usados, junto con nuestros datos de incompatibilidad (ver adelante) para investigar si existe una correlación entre divergencia de secuencias *repC* de pCFN42b, pANU843b y pVF39c e incompatibilidad. Por otro lado, tomando en cuenta que a la fecha únicamente tres regiones replicadoras de plásmidos de *Rhizobium* se han publicado (Mercado-Bianco y Olivares 1993; Turner y Young 1995; Ramírez-Romero *et al.* 1997), y que por lo mismo, no se ha logrado llevar a cabo una clasificación en base a incompatibilidad de plásmidos, resultaría de gran interés aportar nuevos datos acerca de la región replicadora del pCFN42b.

Mediante experimentos de hibridación de DNA, se demostró que un gran número de secuencias del pCFN42b de *R. etli* CFN42, están conservadas en el genoma de *R. leguminosarum* bv.

trifolii ANUB43 y *R. leguminosarum* bv. viciae VF39. Muchas de ellas, incluyendo a los genes *lpaβ1* y *lpaβ2*, están localizadas en los plásmidos pANUB43b y pVF39c. Mientras el dato anterior sugiere un cierto grado de relación estructural y probablemente funcional entre los tres plásmidos, la existencia de secuencias del pCFN42b conservadas en otros replicones distintos a pANUB43b y pVF39c, indican un cierto grado de divergencia estructural entre los tres plásmidos. Esta divergencia se ve apoyada por la diferencia de tamaños entre los tres plásmidos (pCFN42b, 150 kb; pANUB43b, 250 kb; pVF39c, 400 kb).

La diferente organización estructural entre pCFN42b y pVF39c también se refuerza por el hecho de que en el pVF39c, se localiza un operón *fixNOQP* así como los genes *fixK-fixL* (Patschkowski *et al.* 1996), los cuales no existen en el pCFN42b. Secuencias reiteradas de los genes *fixK* y *fixNOQP*, así como una secuencia homóloga al gen *fixL* contenido en el pVF39c, han sido localizadas en el pCFN42f, el plásmido más grande en *R. etli* CFN42 (Girard, datos sin publicar).

La divergencia observada en los tres plásmidos podría estar relacionada con la posición taxonómica que guardan ambas especies (Fig. 10), *R. etli* y *R. leguminosarum* conforman dos linajes claramente distinguibles en base al análisis de la secuencia del gen 16S ribosomal (Martínez-Romero 1994). Adicionalmente a esto, el entorno ecológico de ambas especies es marcadamente diferente, mientras *R. etli* nodula leguminosas tropicales, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y viciae nodulan leguminosas de zonas templadas.

A pesar de la divergencia evolutiva y ecológica observada, una gran parte de la información genética del pCFN42b se ha mantenido en el genoma de *R. leguminosarum* a lo largo de la evolución, aunque no siempre organizada en el mismo replicón. El seguir conservando dichas secuencias, podría ser indicio de la importancia funcional que tienen para la vida de estas bacterias.

Desde el punto de vista evolutivo, pareciera existir una relación más estrecha entre pCFN42b y pANUS43b, ya que ambos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad. Mientras que pVF39c pertenece a un grupo de incompatibilidad distinto. Sin embargo debido a la metodología utilizada (transferencia de plásmidos por conjugación), no podemos descartar la posibilidad que el pVF39c pudiera estar formado por la cointegración de dos replicones. De tal manera que aunque el plásmido mantiene un sistema de replicación similar a pCFN42b y pANUS43b, el resultado de la compatibilidad observada se debe a la funcionalidad del segundo sistema de replicación. Un banco de regiones de replicación de plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad se ha utilizado en enterobacterias para detectar la presencia de múltiples regiones de replicación, independientemente de su funcionalidad en diferentes fondos genéticos (Couturier *et al.* 1988).

Para finalizar, quisiera mencionar que el estudio de las funciones codificadas en plásmidos de *Rhizobium*, no solo es importante desde el punto de vista de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, sino también contribuye a ampliar nuestro conocimiento acerca de la estructura y la función del genoma de esta bacteria.

Asimismo, pensamos que a futuro investigaciones de este tipo pueden tener un fuerte impacto en el estudio de la ecología microbiana a nivel molecular, la cual pretende caracterizar la expresión de genes bacterianos en respuesta a diversos factores físicos, químicos y biológicos los cuales forman parte del entorno ecológico de las bacterias.

CONCLUSIONES

La región genética *lpsβ* localizada en el pCFN42b de *R. etli* CFN42 contiene dos genes (*lpsβ1* y *lpsβ2*) indispensables para la síntesis de LPS en esta bacteria, posiblemente organizados en un operón.

El análisis de similitud de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Lpsβ1 y Lpsβ2, así como datos bibliográficos de la estructura química del LPS, sugieren que la proteína Lpsβ1 puede ser una enzima que transfiera galactosa o ácido galacturónico a la parte del LPS conocida como "core". La proteína Lpsβ2 podría ser una deshidratasa participando en la síntesis de alguno de los deoxi o dideoxi azúcares que enlazan el "core" con el antígeno-O.

Las secuencias homólogas a los genes *lpsβ1* y *lpsβ2* únicamente se encontraron en plásmidos de *R. leguminosarum* bv. trifolii y *R. leguminosarum* bv. viciae y no en el genoma de otros miembros de la familia *Rhizobiaceae*.

Las proteínas Lpsβ1 y Lpsβ2 de *R. etli* y *R. leguminosarum* son funcionalmente equivalentes.

Otras secuencias del pCFN42b como los genes *rnrA* y *rnrB* (resistencia a compuestos tóxicos) y *thiC* (síntesis de tiamina) también están conservadas en plásmidos de *R. leguminosarum*. Además de estos genes, un gran número de secuencias del pCFN42b de *R. etli* se encuentran conservadas en el genoma de *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 y *R. leguminosarum* bv. viciae VF39 aunque no siempre localizadas en el mismo replicón.

Corriente arriba del gen *lpsβ1* se identificó un fragmento del gen *repC* posiblemente involucrado en la replicación del pCFN42b.

La información genética localizada corriente abajo del gen *lpsβ2* no es indispensable para la síntesis de lipopolisacárido en esta bacteria.

REFERENCIAS

- Aguilar, G. R. and Soberón, M. 1996. Cloning and sequence analysis of the *Rhizobium etli* *ccwA* and *ccwB* genes involved in c-type cytochrome biogenesis. *Gene* 182: 129-135.
- Amabile-Cuevas, C.F., and Chicurel, M.E. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189-199.
- Antoine, R. and Locht, C. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms. *Mol. Microbiol.* 6:1785-1799.
- Austin, S., and Nordstrom, K. 1990. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* 60: 351-354.
- Boronin, A. M. 1992. Diversity and relationships of *Pseudomonas* plasmids. In *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology*, eds. Galli, E., Silver, S., Witholt, B. pp. 329, Washington : American Society for Microbiology.
- Brink, B.A., Miller, J., Carlson, R.W., and Noel, K.D. 1990. Expression of *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genes for lipopolysaccharide in strains derived from different *R. leguminosarum* soil isolates. *J. Bacteriol.* 172: 548-555.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Girard, L., Dávila, G., Palacios, R., and Romero, D. 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. *J. Bacteriol.* 173: 1344-1346.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., and Palacios, R. 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 174: 5183-5189.
- Brozak, K. A., Carlson, R. W., and Raetz, C. R. H. 1996. A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* 271:

- Campbell, A.M. 1993. Genome organization in prokaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:837-844.
- Carlson, R. W. 1984. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 158: 1012-1017.
- Carlson, R.W., Kalsmbasa, S., Turowaki, D., Pachori, P., and Noel, K. D. 1987. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *J. Bacteriol.* 169: 4923-4928.
- Cava, J.R., Elias, P.M., Turowaki, D.A., and Noel, K.D. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic region encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* 171: 8-15.
- Cervantes, L. 1997. Participación de los plásmidos endógenos de *Rhizobium etli* en diversas funciones celulares. Tesis de Licenciatura. UAEM.
- Charles, T.C., and Finan, T.M. 1990. Genetic map of *Rhizobium meliloti* megaplasmid pRmeSU47b. *J. Bacteriol.* 172:2469-2476.
- Charles, T. C., and Finan, T. M. 1991. Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated *in vivo*. *Genetics* 127: 5-20.
- Chater, K.F., and Hopwood, D.A. 1989. Diversity of bacterial genetics. In *Genetics of bacterial diversity*, eds. Chater, K.F., and Hopwood, D.A. p 27. London : Academic Press.
- Crespi, M., Messens, E., Caplan, A. B., Van Montagu, M., and Desomer, J. 1992. Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *EMBO J.* 11:795-804.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., and Maas, W. K. 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 52:375-395.

- Delver, E. P., Kotova, V. U., Zavilgelsky, G. B. and Belogurov, A. A. 1991. Nucleotide sequence of the gene *ard* encoding the antirestriction protein of plasmid Colib P9. *J. Bacteriol.* 173: 5887-5892.
- Dénarié, J., and Cullimore, J. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 174: 931-934.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E.W., Helinski, D. R., and Ditta, G. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4403- 4409.
- Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D. R., and Ditta, G. S. 1990. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *J. Bacteriol.* 172: 1400-1408.
- Eisenschenk, L., Diebold, R., Perez-Lesher, J., Peterson, A. C., Peters, N. K., and Noel, K. D. 1994. Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3315- 3322.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., and Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387: 394-401.
- Girard, M. L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R., and Dávila, G. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *J. Bacteriol.* 173: 2411-2419.
- González, R.A. 1996. Obtención y caracterización de mutantes de *Rhizobium etli* CFN42 en genes inducidos por exudados de frijol. Tesis de Maestría. CCH-UACPyP, UNAM.
- González, J. E., Gluckmann, A., Lynne-Reuber, T., and Walker, G. C. 1992. Exopolysaccharides and *Rhizobium meliloti* - alfalfa interactions. In *New horizons in nitrogen fixation*, eds Palacios, R., Mora, J., and Newton, W. E. pp 203-206. Dordrecht: Kluwer Acad. Pub.

- Hawkins, F. K. L., and Johnston, A. W. B. 1988. Transcription of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Microbiol. 2: 331-337.
- Hernández-Lucas, I., Segovia, L., Martínez-Romero, E., and Pueppke, S.G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 2775-2779.
- Hinnebusch, J. and Barbour, A.G. 1992. Linear- and circular-plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. 174: 5251-5257.
- Hinnebusch, J. and Tilly, K. 1993. Linear plasmids and chromosomes in bacteria. Mol. Microbiol. 10:917-922.
- Hynes, M.F., and MacGregor, N.F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Microbiol. 4: 567-574.
- Kadmas, J. L., Brozek, K. A., and Rostz, C. R. H. 1996. Lipopolysaccharide core glycoylation in *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. 271: 32119-32125.
- Keenleyside, W. J., Perry, M., Maclean, L., Poppe, C., and Whitfield, C. 1994. A plasmid-encoded *rjB_{0:54}* gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze. Mol. Microbiol. 11: 437-448.
- Leigh, J.A., and Walker, G.C. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. Trends Gen. 10: 63-67.
- Levin, B.R. 1993. The accessory genetic elements of bacteria: existence conditions and (co)evolution. Curr. Opin. Genet. Dev. 3:849-854.
- Martínez-Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. Plant and Soil 161: 11-20.
- Mercado-Blanco, J., and Olivares, J. 1993. Stability and transmissibility of the cryptic

- plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4. Arch. Microbiol. 160:477-485.
- Mercado-Blanco, J., and Toro, N. 1996. Plasmids in rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids. Mol. Plant-microbe Int. 9:535-545.
- Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M.J., Bourg, G., Allardet-Servent, A., and Ramaz, M. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M Genome. J. Bacteriol. 175:701-705.
- Miranda, J. 1995. Genética molecular de genes involucrados en la expresión de oxidasas terminales en *Rhizobium etli*. Tesis de Doctorado, CCH-UACPYF, UNAM.
- Moëgne-Loccoz, Y., and Weaver, R.W. 1995. Plasmids influence growth of rhizobia in the rhizosphere of clover. Soil. Biol. Biochem. 27: 1001-1004.
- Noel, K. D. 1992. Rhizobial polysaccharides required in symbiosis with legumes, pp. 324-357. In D.P.S. Verma (ed.), Molecular signals in plant-microbe communications. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Novick, R.P. 1987. Plasmid incompatibility. Microbiol. Rev. 51: 381-395.
- Petrovics, G., Patnok, P., Reuhs, B., Kim, J., Thorp, T.A., Noel, K.D., Carlson, R. W., and Kondoros, A. 1993. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. Mol. Microbiol. 8: 1083-1094.
- Patschkowski, T., Schlüter, A., and Priefer, U. B. 1996. *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae contains a second *fnr/fixK*-like gene and an unusual *fixL* homologue. Mol. Microbiol. 21: 267-280.
- Piazinski, J., Croft, L., Taylor, R., Zheng, Q., Rolfe, B. G., and Gunning, B. E. S. 1991. Indigenous plasmids in *Anabaena azollae*: their taxonomic distribution and existence of regions of homology with symbiotic genes of *Rhizobium*. Can. J. Microbiol. 37:171-181.

- Porter, R. D. 1991. Conjugation. In *Modern microbial genetics*, eds Striaps, U.N., and Yashin, R.E. p 157. New York: Wiley-Liss Inc.
- Prakash, R.K., VanVeen, R.J.M., and Schijvevoort. 1981. Restriction endonuclease mapping of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid. *Plasmid* 7:271-280.
- Ramírez-Romero, M. A., Bustos, P., Girard, L., Rodríguez, O., Cevallos, M.A., and Dávila, G. 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology*, in press.
- Slater, J. H., Weightman, A. J., and Godwin-Thomas, D. 1988. Plasmids. In *Microorganisms in action: Concepts and applications in microbial ecology*, eds. Lynch, J.M., and Hobbie, J.E. p 44. Oxford: Blackwell Scientific Pub.
- Suwanto, A., and Kaplan, S. 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. genome: presence of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* 174: 1135-1145.
- Tabata, S., Hooykaas, P. J., and Oka, A. 1989. Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J. Bacteriol.* 171: 1665-1672.
- Turner, S. L., and Young, J. P. W. 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum* cryptic plasmid pRL8J1. *FEMS Microbiol. Lett.* 133: 53-58.
- Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Power, R. S., Amarger, N. and Young, J. P. W. 1996. Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 142:1705-1713.
- Weaver, R.W., Wei, G.R., and Berryhill, D.L. 1990. Stability of plasmids in *Rhizobium phaseoli* during culture. *Soil Biol. Biochem.* 22: 465-469.
- Wilkins, B.M., Rees, C.E., Thomas, A.T., and Read, T.D. 1991. Conjugative events in the recipient cell affecting plasmid promiscuity. *Plasmid* 25: 227.

Yanagita, T. 1990. Natural Microbial communities, ecological and physiological features. Spring-Verlag, Japan, pp. 312-315.

Zambryski, P., Tempe, J., and Schell, J. 1989. Transfer and Function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. Cell 56: 193-201.

Tabla I. Características fenotípicas de *Rhizobium etli* CFM42 y de sus derivadas curadas de plásmidos.

FENOTIPO	CFM42	pa ⁻	pb ⁻	pc ⁻	pd ⁻	peΔ	pf ⁻
Morfología de colonia	gomosa	gomosa	resaca	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa
Mobilidad	+	+	-	+	+	+	+
Floculación ^b	-	-	+	-	-	-	-
Producción de acetileno	+	+	+	+	-	+	+
Nodulación	+	+	+ ^c	+	-	+	+
Fijación de N ₂ ^d	++	++	-	++	-	++	+ ^c
Crecimiento en PY ^e	++	++	+ ^c	+	++	+	++
Crecimiento en MMF	+++	++	+ ^c	+	++	+ ^c	-
Competencia ^f	+	+	< ^g	<	-	<	<

^a Se estudió en placas de PY con agar suero al 0.3%

^b El término floculación se refiere al crecimiento anormal de una bacteria en medio líquido, formando agregados los cuales se depositan en el fondo del tubo de ensayo.

- , crecimiento normal; +, floculación.

^c +, nódulos normales con actividad de nitrogenasa; + -, nódulos anormales; vacíos y sin actividad de nitrogenasa; -, ausencia de nódulos.

^d ++, nivel normal de reducción de acetileno; + -, 65% < CFM42; -, no hay reducción de acetileno.

^e Medio de cultivo rico. ++, nivel normal de crecimiento; +, 25% < CFM42; + -, 40% < CFM42; -, no hay crecimiento.

^f Medio mínimo. +++ , nivel normal de crecimiento; ++, 25% < CFM42; +, 40% < CFM42; + -, 60% < CFM42; -, no hay crecimiento.

^g Competencia entre dos copias por ocupación de plásmidos. +, capacidad competitiva normal; <, menos competitiva que CFM42; -, incapaz de nodular.

^h La capacidad competitiva se determinó en una derivada curada de pb pero complementada con los genes *pspA*.

Tabla 2. Identidad y similitud entre el ORF1 incompleto del pCFN42b de *Rhizobium etli* CFN42 con el extremo carboxilo de proteínas RepC de diversas bacterias.

Polipéptido similar (plásmido)	Número de aminoácidos	Identidad (%)	Similitud (%)	Número de acceso
<i>R. etli</i> RepC (pCFN42d)	149	62.3	72.6	U80928
<i>R. leguminosarum</i> RepC (pRL8J1)	151	60.8	74.1	X89447
<i>A. rhizogenes</i> RepC (pRiA4b)	150	60.5	73.4	X04833
<i>Paracoccus varians</i> RepC (pTAV1)	153	42.8	61.7	U60522
<i>A. tumefaciens</i> RepC (pTiB6S3)	185	39.4	63.2	M24529
<i>R. meliloti</i> RepC (pRmeGR4a)	169	30.6	53.1	X69105

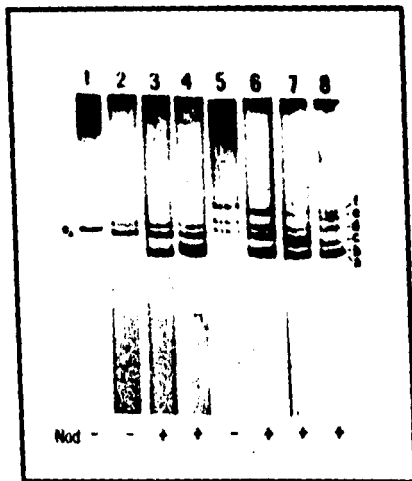


Fig. 1. Perfil de plásmidos de las cepas derivadas de *R. sol* CFN42 curadas de múltiples plásmidos. Cepas: 1, CFNX218: (peΔ); 2, CFNX217 (pd, peΔ); 3, CFNX216 (pb, pd, peΔ); 4, CFNX215 (pa, pb, pd, peΔ); 5, CFNX220 (pd, peΔ, pf); 6, CFNX214 (pa, pb, pd, peΔ, pf); 7, CFNX185 (pa, pb, pc, pd, peΔ); 8, cepa parental CFN42 con todos sus plásmidos. En la parte baja de la figura se indica la capacidad (+) o incapacidad (-) para formar nódulos sobre las raíces de frijol.

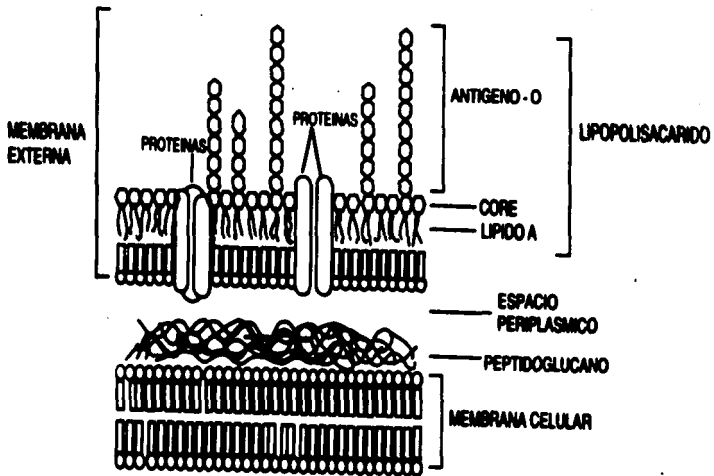


Fig. 2. Estructura de la superficie celular de una bacteria Gram- negativa

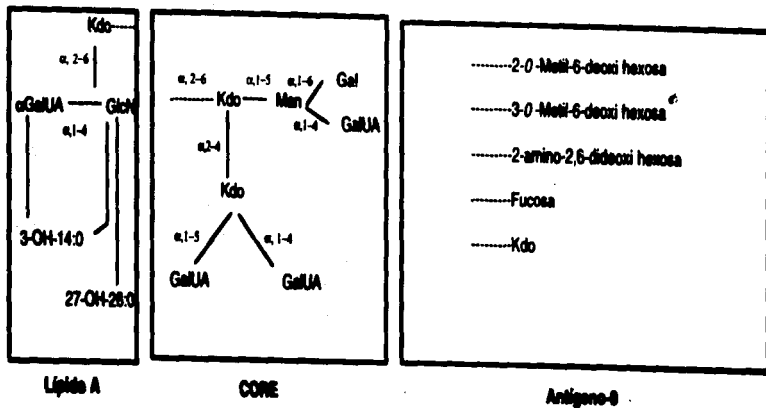


Fig. 3. Composición química del lipopolisacárido de *R. sol* CFM42. Kdo, ácido 3-deoxi-D-mano-2- octulosónico. Gal, galactosa. GlcN, glucosamina. 3-OH-14:0 y 27-OH-26:0, ácidos grasos hidroxilados. GalUA, ácido galacturónico. Man, manosa.

	1		50		100			
RcORF1	...NSNhyt TELRPFLFK	QGAtVdGSt galeprarIA tqgkyfpm	aansavagv gksFFMGLV	LqCetaay	GGqevVWR	DLSRAAPVR		
RcRepC	HIGNSKPEVS nLdRPVSEK	QGA.....Ka	Slslop.lmE sqrAFFMGLV	LaCQeladr	afPg.VGmE	DLSRAAPVR		
RleRepC	HIGNSKTES nLdRPVSEK	QGe.....Ks	epkhtERAD epqAFPMW	LrACVelnP	GGQsIGWR	DLSRAAPVR		
ArRepC	HIGNSKPEVS nLdRPVSEK	QGA.....NP	Seidra.RSE pIAAFPMW	LaACPlgnf	GGQsVnWR	DLSRAAPVR		
PvRepC	HNSKNSKI DLdRPVSEK	gaaahapdvE tda.....P	gadVeedtr rVpkiPLW	layCslRfP	Yq.GdlrW	qLPAACWR		
AtRepC	HIGNSKPSI pLdlygipal	paaggy.....t	vEfdmVRSI pkrELPGLV	LaACViel	agQeIrW	DfLstvelR		
RcRepC	...higittp lqPdsSDqr	rshYdQLSs pLgnaSkA	feEslrKrs	..Elngprl	rhamvalqv	LrVhAlNY	Gtap..tW	DLSRAAPVR
Consensus	HIGNS-PEV- ELdRPVSEK	QGA-A-SE-A-A-E--R-IG	S-E---VNSE	---AFPEGLV	L-ACV-IR-Y	GGQ--GWR	DLSRAAPVR	
		
	101		150		200			
RcORF1	SRLVWPSBY egkCEWHPF	hMAIVIAcVL ERag..hIM	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	.spigrRG.....		
RcRepC	SRLVWPSBY GQACWHPF	hMAIVIAcIL ERAn..fIM	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	.spigrRG.....		
RleRepC	SRLVWPSBY GQACWHPF	hMAIAIAcIL qAg..hIM	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	.spigrRG.....		
ArRepC	SRLVWPSBY GQACWHPF	hMAhMAcIL ERAn..fIM	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	.spigrRG.....		
PvRepC	paWdZaSM egkCEWHPF	qslvVvnd. ERta..dIR	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	.spigrRG.....		
AtRepC	paWdZaSM egkCEWHPF	hMAITLaly qAd..qIG	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	.spigrRG.....		
RcRepC	rfaIRdRr rrvhVhag	qAVNVvVL EHydrqW	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	.spigrRG.....		
Consensus	SRLVWPSBY GQACWHPF	hMAIAIAcIL ERa---fIM	asPTLAcLR	RAZNSPFLG	PRINDLWRM	---G-KAG-----		
	*****		
	211							
RcORF1							
RcRepC							
RleRepC							
ArRepC							
PvRepC							
AtRepC	lirtlgrk k							
RcRepC							
Consensus	-----							

Fig. 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del ORF1 incompleto de *R. etli* CFN42 con el extremo carboxilo de las proteínas RepC homólogas mostradas en la tabla 2. La parte con menor homología entre las siete secuencias está señalada por una caja. Los aminoácidos idénticos en las siete secuencias están marcados en negras. Los aminoácidos idénticos en el ORF1 y en las proteínas RepC de *R. etli* CFN42 (pCFN42d), *R. leguminosarum* (pRL811) y *A. rhizogenes* (pRIA4b) están marcados con un asterisco en el consenso.

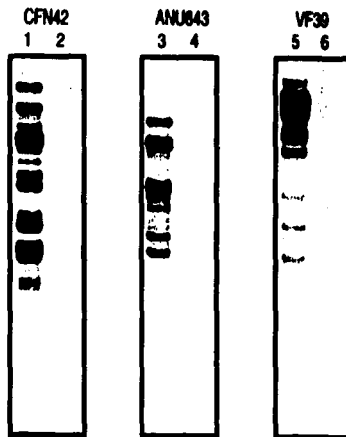


Fig. 5. Genoma total de *R. etli* CFM42, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 digeridos con *Eco*RI e hibridados con el plásmido pCFM42b completo. Carriles 1, 3, 5, corresponden a las cepas silvestres. Carriles 2, 4, 6, corresponden a las derivadas curadas de los plásmidos pCFM42b, pANU843b y pVF39c respectivamente.

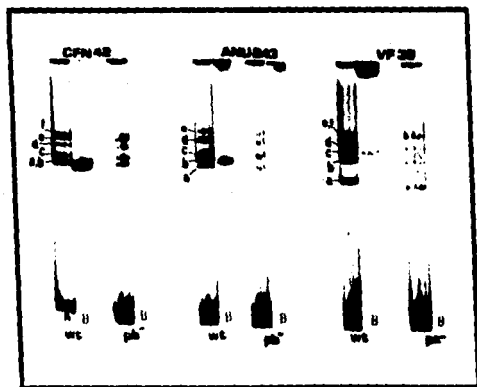


Fig. 6. Localización de secuencias homólogas al plásmido pA31, en *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. triolii ANU843 y bv. viciae VF39. Perfiles de plásmidos (carriles A), de las cepas silvestres (wt) y derivadas curadas de los plásmidos pCFN42b, pANU843b y pVF39c (pb^a, pb^b, pb^c) fueron hibridados con el pA31. La presencia de secuencias homólogas fué detectada mediante hibridaciones tipo Southern (carriles B).

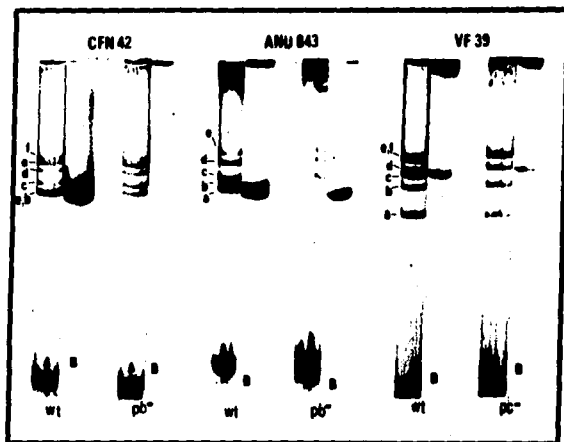


Fig. 7. Localización de secuencias homólogas al plásmido pJMR01. Perfiles de plásmidos (carriles A) de *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 y bv. viciae VF39 cepas silvestres (wt) y derivadas curadas de los plásmidos pCFN42b, pANU843b y pVF39c (pb⁻, pb⁻, pc⁻), fueron hibridados con el pJMR01. La presencia de secuencias homólogas detectadas mediante hibridaciones tipo Southern se observa en los carriles B.

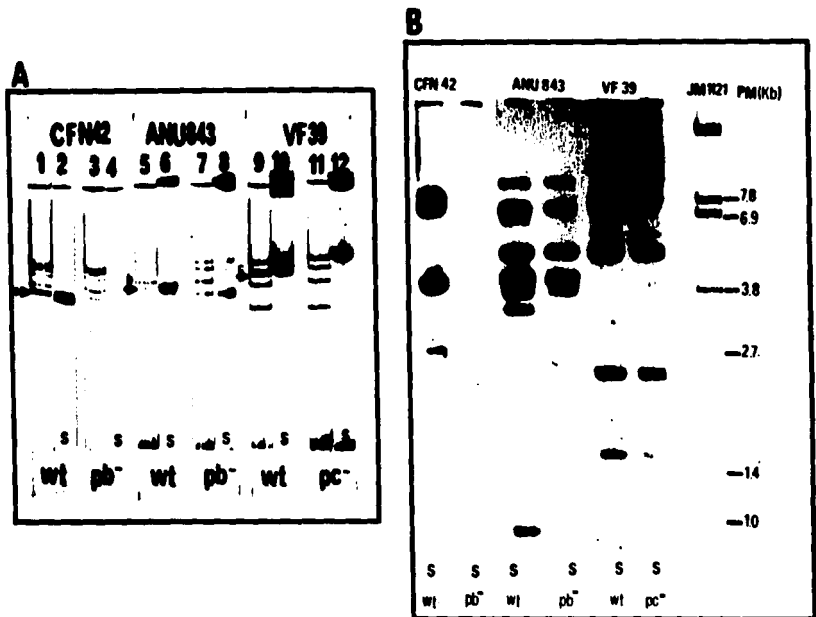


Fig. 8. Localización de secuencias homólogas al cósmido JM1121, en cepas de *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 y bv. viciae VF39. Perfiles de plásmidos (A) y genoma total digerido con *EcoRI* (B) de cepas silvestres (wt) y derivadas curadas de los plásmidos pCFN42b, pANU843b y pVF39c (pb⁻, pb⁻, pc⁻), fueron hibridados con el cósmido JM1121. Hibridaciones tipo Southern (camiles S) revelan la presencia de secuencias homólogas. En la Fig. B también se muestra el peso molecular de los fragmentos de DNA del cósmido JM1121 digerido con *EcoRI*.

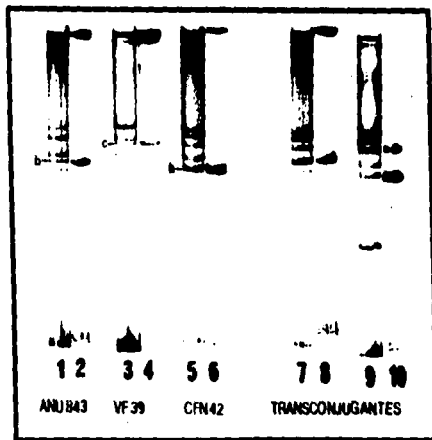


Fig. 9. Estudio de incompatibilidad entre los plásmidos pCFN42b, pANU843b y pVF39c. En los carriles 1 y 3 se muestra el perfil de plásmidos de las cepas silvestres *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 utilizadas como donadoras de los plásmidos pANU843b y pVF39c respectivamente. El carril 5 corresponde a *R. etli* CFN42 silvestre, utilizada como receptora de conjugación. Los carriles 2, 4 y 6 son señales de hibridación que permiten ver la posición de los plásmidos pANU843b, pVF39c y pCFN42b. El patrón de plásmidos de la transconjugante de *R. etli* CFN42 llevando el pANU843b (carril 7), muestra una sola señal de hibridación con la sonda pAGS10 (genes *lps*), correspondiente al pANU843b (carril 8). El perfil de plásmidos de la transconjugante llevando el pVF39c (carril 9), muestra dos señales de hibridación con el mismo detector (carril 10), indicando que en esta transconjugante coexisten los plásmidos pCFN42b y pVF39c. La banda de menor peso molecular en el carril 9, corresponde al plásmido RP4-4 utilizado para movilitar el pVF39c.

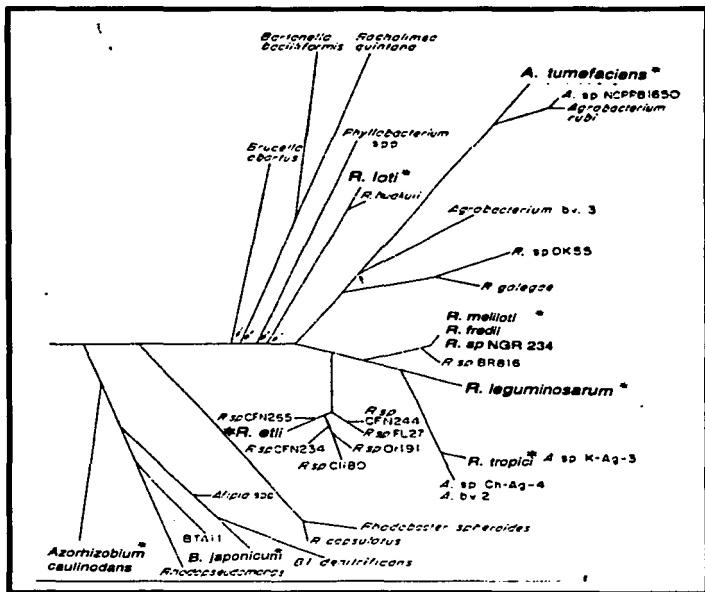


Fig. 10. Filogenia de la familia Rhizobiaceae y otras bacterias afines, basada en el análisis de secuencia de los genes que codifican para el ARNr 16S. (Tomado de Martínez-Romero 1994).