



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE LOCI INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE
LIPOPOLISACÁRIDO EN *Rhizobium tropici* CIAT899**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ERNESTO ALDO ORMEÑO ORRILLO

CUERNAVACA, MOR.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Gladys y Walter; y a mis hermanas, Jessica y Paola, por su amor incondicional.

Nunca terminaré de agradecer a mis padres el haberme alentado y apoyado a buscar un mejor futuro aún cuando eso significó estar alejados.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a la Dra. Esperanza Martínez Romero, por haberme recibido en su grupo de investigación, por haberme guiado durante estos años, y por su constante apoyo sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Gracias Esperanza por el ambiente de libertad de pensamiento que propicias.

A las Dras. Gloria Soberón y Valeria Souza, por sus valiosos consejos y sugerencias durante los exámenes tutorales.

A mis compañeras de lugar, Lulú e Ivonne, por todos estos años de amistad y apoyo mutuo, además de la grata y amena compañía.

A Julio Martínez y Mónica Rosenblueth, por su amistad, interesantes pláticas y valiosos consejos.

A todos los compañeros del laboratorio a los que he podido conocer durante estos años les agradezco su ayuda, consejos, y el hacer del laboratorio un lugar de trabajo agradable. Perdonen que no los nombre individualmente pero son tantos que temo olvidar algún nombre.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a Jorge y Martín por su invaluable apoyo en las labores del laboratorio.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	9
Artículo “Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis”	10
OBJETIVOS	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
Artículo “Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899”	23
Análisis bioinformático de un grupo de genes para biosíntesis de LPS en <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	40
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	57
APÉNDICE	
Lista de cepas y plásmidos utilizados en este estudio	60

RESUMEN

Los rizobios son bacterias Gram negativas que establecen relaciones simbióticas con plantas leguminosas en la cual fijan nitrógeno atmosférico y se lo proporcionan a la planta. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se asocia con cepas de varias especies de *Rhizobium*. Entre los simbioses del frijol, *Rhizobium tropici* CIAT899 es muy interesante por su resistencia a diferentes tipos de estreses medioambientales y porque puede ser usada como inoculante para frijol bajo condiciones de suelos ácidos donde otros rizobios no prosperan. Los polisacáridos de superficie de los rizobios son determinantes moleculares necesarios para el establecimiento de una simbiosis exitosa. Entre ellos, los lipopolisacáridos (LPS) son considerados cruciales para las simbiosis entre los rizobios y aquellas leguminosas como el frijol que forman nódulos de tipo determinado. Las investigaciones sobre la genética de la biosíntesis de LPS en los rizobios del frijol se han enfocado en una sola cepa, *R. etli* CFN42. En este trabajo presentamos la caracterización de tres loci involucrados en la biosíntesis de LPS en *R. tropici* CIAT899. Los loci fueron identificados a través del análisis de mutantes obtenidas por inserción de un transposón. Los genes identificados codifican para los siguientes productos probables: el componente con actividad ATPasa de un transportador ABC de antígeno O (*wzt*), una deshidratasa de nucleótido azúcar (*lpsβ2*), y una enzima que produce GDP-D-manosa (*noeJ*). Corriente arriba de *wzt* se encontró el componente transmembranal del transportador (*wzm*). Los genes *wzt* y *wzm* genes presentaron baja similitud con sus homólogos en *R. etli* CFN42 y no se observó complementación funcional entre ellos. El gen *lpsβ2* presentó inesperadamente una alta similitud con el homólogo de *R. etli* CFN42 y los experimentos de complementación demostraron que se trata de ortólogos. Por otro lado, se observó complementación funcional entre *lpsβ2* de *R. tropici* y el gen *wbpM* de *P. aeruginosa* lo que indicó que *lpsβ2* esta implicado en la biosíntesis de D-acetilquinosamina. Las mutaciones en *wzt* y *lpsβ2* provocaron la producción de moléculas de LPS sin el dominio distal conocido como antígeno O. En la mutante *noeJ* se observó una banda de LPS rugoso con migración electroforética diferente a la de la cepa parental lo que sugirió que el dominio del LPS conocido como oligosacárido núcleo estaba truncado. Como se esperaba, la simbiosis con frijol se vio

afectaba, produciéndose solo pseudonódulos Fix⁻ con las mutantes *wzt* y *lpsβ2*, y ningún nódulo con la mutante *noeJ*. Además de asociarse con frijol, *R. tropici* CIAT899 es capaz de proliferar en la rizósfera y el interior de la raíz de maíz por lo que también investigamos el efecto de estas mutaciones sobre su habilidad de colonizar a esta planta. Observamos que las mutaciones afectaron negativamente la colonización. Al considerar tanto los efectos pleiotrópicos como los directos de las mutaciones encontramos evidencias que los LPS juegan un rol protector frente a los compuestos antimicrobianos producidos por el maíz. Finalmente, al secuenciar las zonas aledañas al locus *wzt* descubrimos un grupo de genes para la biosíntesis de LPS. Algunos de estos genes codifican para productos probables aún no descritos en rizobios como la transferasa inicial requerida para la biosíntesis del antígeno O, y la ligasa que realiza la reacción final en el procesamiento del antígeno O.

ABSTRACT

The Gram negative bacteria known as rhizobia establish symbiotic relationships with legumes where the bacteria fix atmospheric nitrogen and supply it to the plant. Common beans (*Phaseolus vulgaris*) associate with strains belonging to several species within the *Rhizobium* genus. Among the bean symbionts, *Rhizobium tropici* CIAT899 is particularly interesting because it is resistant to environmental stresses and because it can be used as inoculant for beans grown in acid soils where other rhizobia fail to induce nodulation. The rhizobial surface polysaccharides are molecular determinants required for the establishment of a successful symbiosis. In particular, the lipopolysaccharides (LPS) are considered crucial for symbioses between rhizobia and those legumes like beans which form determinate-type nodules. The studies on the genetics and biosynthesis of LPS of bean rhizobia have focused on only one strain, *R. etli* CFN42. In this work, we present the characterization of three loci involved in LPS biosynthesis in *R. tropici* CIAT899. The loci were discovered by the analysis of transposon mutants. The identified genes coded for the following putative products: the ATPase component of an ABC type O antigen transporter (*wzt*), a nucleotide sugar dehydratase (*lpsβ2*), and an enzyme producing GDP-D-mannose (*noeJ*). The transmembrane component of the O antigen transporter (*wzm*) was found upstream of *wzt*. Both, *wzm* and *wzt*, showed low similarity with their *R. etli* CFN42 homologs, and no functional complementation was observed between them. Unexpectedly, the *lpsβ2* gene showed high similarity to the *R. etli* CFN42 homolog and was complemented by it. Additionally, the functional complementation of *lpsβ2* by the *P. aeruginosa* *wbpM* gene suggested that the *R. tropici* *lpsβ2* gene product is involved in D-acetylquinosamine biosynthesis. Mutations in *wzt* and *lpsβ2* resulted in an O antigen minus phenotype. The *noeJ* mutant showed a rough LPS band with a different electrophoretic migration behavior in comparison to the one produced by the parental strain suggesting a truncated LPS core. As expected, the symbiosis of the mutants with beans was severely compromised. The *wzt* and *lpsβ2* mutants elicited the formation of pseudonodules, while the *noeJ* showed a Nod⁻ phenotype. The LPS mutations were also found to impair the maize rhizosphere and root colonization abilities of *R. tropici*. By analyzing this phenotype we found evidence that the LPS play a

protecting role against maize antimicrobials during colonization. Finally, a LPS gene cluster was found around the *wzt* gene. Some of the genes of this cluster code for predicted products not yet described in rhizobia, such as an initial transferase for O antigen biosynthesis and the ligase catalyzing the last step in O antigen processing.

INTRODUCCIÓN

Rizobio es el nombre común con el que se conocen a aquellas bacterias Gram negativas de la división Proteobacteria que pueden establecer simbiosis mutualistas con plantas leguminosas. Los rizobios invaden las raíces (en algunos casos los tallos), inducen la formación de hipertrofias denominadas nódulos y colonizan el interior de las células de estos nódulos. Las bacterias sufren un proceso de diferenciación y, entre otros, expresan los genes necesarios para sintetizar la enzima nitrogenasa gracias a la cual pueden fijar nitrógeno atmosférico para proporcionárselo a su planta hospedera. La asociación rizobio-leguminosa es estudiada principalmente debido a la aplicación agronómica que se le puede dar para reducir o eliminar la necesidad de fertilización química nitrogenada durante el cultivo de leguminosas.

Las culturas precolombinas domesticaron cuatro especies de leguminosas del género *Phaseolus*. Entre ellas, *P. lunatus* (frijol Lima, ibe o pallar) y *P. acutifolius* (escomite) son noduladas mayoritariamente por rizobios de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium* (Anderson et al., 2002; Ormeño-Orrillo et al., 2006). Esta preferencia por *Bradyrhizobium* parece ser la característica ancestral del género *Phaseolus*, y es compartida con muchas leguminosas de origen tropical o subtropical (Parker, 2002; Ormeño-Orrillo et al., en preparación). Por el contrario, del frijol común (*P. vulgaris*) y del ayocote (*P. coccineus*) se obtienen principalmente cepas de crecimiento rápido del género *Rhizobium*. Cuando el frijol común se cultiva en suelos neutros o alcalinos, sus principales simbiosis resultan ser cepas de las especies *R. etli* y *R. gallicum* (Segovia et al., 1993; Silva et al., 2003) pero cuando se cultiva en suelos ácidos tropicales, otra especie, *R. tropici*, se convierte en el simbiote mayoritario (Martínez-Romero, 2003). *R. tropici* CIAT899 es la cepa tipo de esta última especie (Martínez-Romero et al., 1991). Esta cepa tiene muchas características interesantes como el ser tolerante a acidez, altas temperaturas, salinidad y altas concentraciones de metales pesados (Graham et al., 1994; Martínez-Romero et al., 1991; Riccillo et al., 2000; Nogales et al., 2002).

Los lipopolisacáridos (LPS) son glucolípidos que constituyen el componente mayoritario de la monocapa expuesta de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Dada su localización, los LPS intervienen en la interacción con el medioambiente y posibles hospederos eucariontes. Los LPS son importantes factores de virulencia de las bacterias patógenas de animales o de plantas (Newman et al., 2001; Lerouge y Vanderleyden, 2002). En los rizobios, varios estudios han demostrado que los LPS son necesarios para la interacción con las leguminosas (Kannenberg et al., 1998; Noel y Duelli, 2000; Fraysse et al., 2003; Becker et al., 2005). Las mutantes de rizobios con alteraciones estructurales en sus LPS muestran interacciones defectuosas con sus hospederos. Esas deficiencias varían desde la completa ausencia de nodulación en la planta o la formación de nódulos con morfologías aberrantes que no son colonizados por el rizobio, como ocurren en la pareja *R. etli*-frijol (Noel y Duelli, 2000); hasta menor competitividad, deficiencias en la diferenciación del rizobio dentro de la célula hospedera y menores tasas de fijación de nitrógeno como se ha reportado para *Sinorhizobium meliloti* en asociación con alfalfa (*Medicago sativa*) (Campbell et al., 2002; Campbell et al., 2003). Los fenotipos simbióticos varían de acuerdo a la pareja de simbiosis, así que es muy probable que los LPS cumplan diferentes funciones según el rizobio y planta hospedera.

Se han propuesto varias funciones para los LPS durante la simbiosis: suprimir respuestas de defensa de la planta, actuar como señal de comunicación entre los simbiosis, ocultar otros componentes superficiales que puedan afectar negativamente a la simbiosis, contribuir a adaptar la superficie celular para un mejor contacto con la membrana de la célula hospedera, o actuar como barrera protectora frente a los compuestos antimicrobianos de la planta (Noel y Duelli, 2000; Lerouge y Vanderleyden, 2002; Becker et al., 2005). Sin embargo, hasta el momento solo escasa o ninguna evidencia existe para asignar algún rol específico. La evidencia con mayor peso ha sido presentada recientemente en el caso de *S. meliloti* cuyos LPS pueden suprimir la expresión de genes relacionados a respuestas de defensa en *Medicago truncatula* (Tellstroem et al., 2007).

Si bien no se han establecido roles específicos para los LPS en la mayoría de las simbiosis analizadas, aún se considera que el estudio de la genética y biosíntesis de LPS es la mejor herramienta con el fin de comprender el papel de estas moléculas. En el caso de los rizobios aislados del frijol, los estudios al respecto se han enfocado sólo en la cepa *R. etli* CFN42. Es posible que se puedan lograr avances en el entendimiento de la función de los LPS al comparar la información disponible sobre *R. etli* CFN42 con la obtenida de un modelo de estudio alternativo de simbiote de frijol. Por este motivo iniciamos este estudio exploratorio sobre la genética de biosíntesis de LPS en *R. tropici* CIAT899.

Los rizobios no sólo interactúan con leguminosas sino que pueden proliferar en la rizósfera y rizoplano de otras plantas promoviendo su crecimiento, e incluso comportarse como endófitos, es decir colonizadores del interior de la planta. Esta faceta de los rizobios ha sido muy poco estudiada en comparación a su interacción con leguminosas y no se conocen los mecanismos moleculares que participan en ella. Recientemente se demostró en nuestro laboratorio que *R. tropici* CIAT899 es un endófito competitivo de maíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2004). En otras bacterias se ha observado que los LPS son importantes para la colonización de la rizósfera y del interior de la raíz, sin embargo no se ha establecido el rol de los LPS en este tipo de interacción (Dekkers et al., 1998). Así, vislumbramos la posibilidad de estudiar no solo la genética de biosíntesis de LPS en CIAT899 sino también explorar el papel de los LPS de este rizobio durante la colonización de maíz.

ANTECEDENTES

Artículo de revisión:

“Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis”

Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis

Ernesto Ormeño-Orrillo*

RESUMEN. Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes mayoritarios de la membrana externa de las células Gram negativas y, por su ubicación, son importantes mediadores de las interacciones entre estas bacterias con su medio ambiente y otros organismos. La familia Rhizobiaceae de las α -Proteobacterias incluye a los rhizobia y agrobacterias, microorganismos que establecen relaciones simbióticas o parasíticas con plantas. Mutantes deficientes en la biosíntesis de LPS muestran interacciones anómalas con sus hospederos. La importancia agronómica de la interacción entre los rhizobia y agrobacterias con las plantas ha promovido un gran número de estudios sobre los LPS de estas bacterias. En los últimos años se han determinado las estructuras completas de uno o varios de los dominios de los LPS de Rhizobiaceae. Asimismo, se han realizado importantes avances en la determinación de pasos metabólicos para la biosíntesis de los LPS en estas bacterias. En esta revisión se proporciona un panorama general sobre la estructura y biosíntesis de los LPS en *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*, enfatizando los avances más recientes en el área.

Palabras clave: Lipopolisacáridos, Rhizobiaceae, biosíntesis, microorganismos.

ABSTRACT. The lipopolysaccharides (LPS) are major components of the outer membrane of Gram negative bacteria and, because of their location, are important mediators in the interaction between these bacteria and their environment and other organisms. The α -Proteobacterial family Rhizobiaceae includes the rhizobia and agrobacteria, microorganisms which establish symbiotic or parasitic relationships with plants. Mutants deficient in LPS biosynthesis show anomalous interactions with their hosts. The agronomical relevance of the relationship between rhizobia and agrobacteria with plants has promoted a large number of studies on the LPS from these bacteria. The complete structures of one or several domains of LPS from Rhizobiaceae have been determined in the last years. Additionally, several metabolic steps in the biosynthesis of these molecules have been elucidated. This review aims at the description of the more recent findings on the structure and biosynthesis of LPS in *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Agrobacterium*.

Key words: Lipopolysaccharides, Rhizobiaceae, biosynthesis, microorganisms.

INTRODUCCIÓN

Todas las células poseen una membrana citoplasmática compuesta de una bicapa de fosfolípidos que delimita el interior celular. Adicionalmente a esta "frontera", un grupo de bacterias, denominadas Gram negativas, evolucionaron desarrollando una segunda membrana exterior a la citoplasmática (Fig. 1). Esta membrana externa tiene una con-

figuración asimétrica: la cara interna está compuesta de fosfolípidos, mientras que la externa está compuesta mayoritariamente de unas moléculas únicas en la naturaleza denominadas lipopolisacáridos (LPS).

Los LPS son glucolípidos anfipáticos complejos. Constituyen el 3.5% del peso seco total de una célula promedio de *Escherichia coli* y el 75% de la superficie de la membrana externa.^{31,37} Estructuralmente pueden dividirse en tres dominios: lípido A, oligosacárido núcleo (ON) y antígeno O (Fig. 2). El lípido A está constituido de un disacárido al que están unidos ácidos grasos, los cuales anclan las moléculas de LPS a la membrana externa. Una cadena corta de monosacáridos unida al lípido A constituye el ON. El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades de monosacáridos u oligosacáridos repetidos muy variables, está unido al ON y es el dominio distal de la molécula de LPS.⁴⁶

El antígeno O puede no estar presente en algunas especies e incluso en algunas cepas de una misma especie. Cuando esto sucede, generalmente las colonias presentan una apariencia rugosa y el LPS producido se denomina LPS rugoso o LPS II, ya que migra más rápido en geles de SDS-PAGE que las moléculas con antígeno O que son llamadas LPS liso o LPS I.⁴⁶

Gracias a los LPS la membrana externa tiene la capacidad de excluir compuestos hidrofóbicos, siendo así una

ABREVIATURAS

Glc, glucosa
Gal, galactosa
Ram, ramnosa
Fuc, fucosa
Ara, arabinosa
Man, manosa
6dTal, 6-desoxi-talosa
GlcN, glucosamina
GlcNAc, acetilglucosamina
GlcNato, GlcNato
QuiNAc, acetilquinososamina

ManNAc, acetilmanosamina
GalA, ácido galacturónico
GlcA, ácido glucurónico
Kdo, ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico
DHA, ácido 3-desoxi-2-heptulosárico
LPS, lipopolisacárido
SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
ACP, proteína acarreadora de grupos ácidos
27-OH C28:0, ácido 27 hidroxioctacosanoico
ON, oligosacárido núcleo
ORF, marco abierto de lectura

* Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Received August 1, 2005; received in revised form November 12, 2005; accepted December 13, 2005.

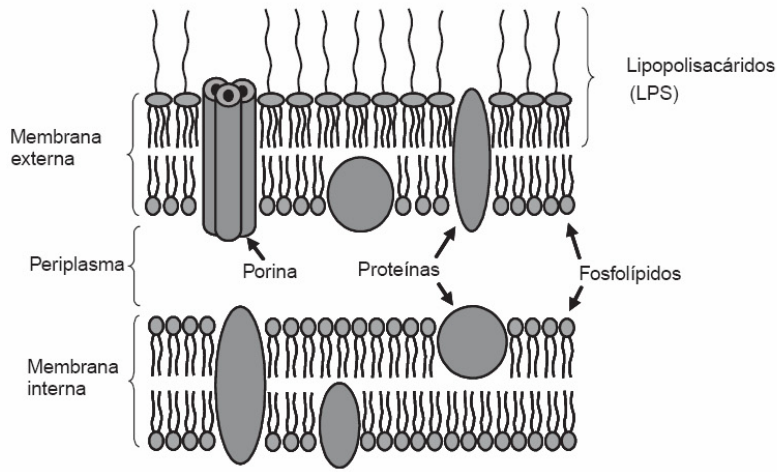


Figura 1. Representación esquemática de la envoltura celular de una bacteria Gram negativa.

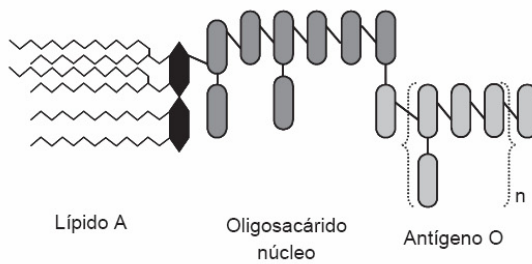


Figura 2. Esquema de una molécula de lipopolisacárido mostrando sus tres dominios estructurales. En el lípido A, las líneas zigzagueantes representan ácidos grasos y los hexágonos representan el disacárido. Los óvalos en gris oscuro representan los azúcares componentes del oligosacárido núcleo y los óvalos en gris claro, los azúcares del antígeno O. Los óvalos entre corchetes representan la unidad repetida del antígeno O.

barrera de permeabilidad protectora contra muchos antibióticos y xenobióticos.^{18,31} Por este motivo no sorprende que los LPS sean esenciales para la viabilidad de la mayoría de bacterias Gram negativas, siendo la unidad mínima necesaria el lípido A y los Kdo del ON.³⁷

RHIZOBIA Y AGROBACTERIAS

La familia Rhizobiaceae de las α -Proteobacterias incluye a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*.⁵³ Estas bacterias Gram negativas habitan el suelo y muchas especies son capaces de inducir la formación de hipertrofias en las raíces de ciertas plantas. En el caso de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, estas hipertrofias son llamadas nódulos y se desarrollan sólo en plantas leguminosas.

Las bacterias colonizan estos nódulos y establecen una simbiosis mutualista fijando nitrógeno atmosférico para la planta.³³ Por el contrario, las especies de *Agrobacterium* que inducen hipertrofias son patógenas que modifican el metabolismo de las células de estos tumores para utilizarlas como fuentes de nutrientes.^{35,36}

Los polisacáridos de superficie, incluyendo los LPS, intervienen en la interacción entre las plantas y las bacterias simbiotes o patógenas.¹⁷ En *Rhizobium* los LPS son esenciales para que las bacterias colonicen las células del interior de los nódulos de tipo determinado.²⁷ La función de los LPS en *Sinorhizobium* no fue clara durante muchos años, sin embargo ahora se reconoce que son determinantes de la competitividad y efectividad simbióticas.^{7,8} En *Agrobacterium* los LPS son factores de virulencia que intervienen en la adhesión de las células a las raíces de la planta hospedera.³⁵

La mayor parte del conocimiento sobre los LPS se ha derivado de estudios sobre las especies patógenas de la familia Enterobacteriaceae.⁴⁶ Sin embargo, la importancia agronómica de la interacción entre los rhizobia y agrobacterias con las plantas ha promovido un gran número de estudios sobre los LPS de estas bacterias. En los últimos años el análisis de los LPS en Rhizobiaceae se ha enfocado no sólo en la descripción de la composición lipídica y de monosacáridos, sino también en la determinación de la estructura completa de uno o varios de sus dominios. Asimismo, se han realizado avances en la determinación de algunos pasos metabólicos para la biosíntesis de los LPS en estas bacterias. El objetivo de la presente revisión es proporcionar un panorama general sobre la estructura y biosíntesis de los LPS en los tres géneros mencionados de

la familia Rhizobiaceae enfatizando los avances más recientes en el área. Se discutirán brevemente algunas de las relaciones entre estructura-biosíntesis y la función de estas moléculas cuando sea relevante. Al lector interesado se le sugiere consultar las excelentes revisiones publicadas recientemente sobre la función de los LPS en rhizobia.^{17,31}

ESTRUCTURA DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS EN RHIZOBIACEAE

Lípido A

Como se mencionó anteriormente, los LPS de enterobacterias han sido extensamente estudiados y por este motivo constituyen el arquetipo contra el que se comparan todos los demás. En estas bacterias, el lípido A es un disacárido compuesto de unidades de GlcN unidas por un enlace $\beta(1'-6)$, fosforilado en las posiciones 1 y 4', y acilado en las posiciones 2, 3, 2', 3' (Fig. 3A). Los grupos acilo en las posiciones 2' y 3' tienen una acilación secundaria formando derivados aciloxi-acil (Fig. 3A). Pueden presentarse variaciones en el largo de los grupos acilo y en las acilaciones secundarias entre cepas y especies.⁴⁶

El primer lípido A descrito con detalle en rhizobia fue el de la cepa CE3[§] de *R. etli*.⁴ A diferencia de la molécula sintetizada por enterobacterias, carece de grupos fosfato, está sustituido con un residuo de GalA en la posición 4' y un residuo de GlcNato reemplaza a la GlcN proximal (Fig. 3B). Además, posee un inusualmente largo ácido graso hidroxilado de 28 carbonos (27-OH C28:0) en la posición 2' formando un derivado aciloxi-acil. Este ácido graso a su vez está acilado con un residuo de β -hidroxibutirato (Fig. 3B). Estudios más recientes utilizando mejores técnicas de purificación y de análisis han demostrado que el lípido A de *R. etli* CE3 es más heterogéneo de lo que se pensaba.^{41,42} Se han caracterizado cuatro moléculas diferentes pero relacionadas. Dos de ellas no presentan el residuo de GlcNato por lo que el disacárido es igual al de enterobacterias (Fig. 3C), y dos no están aciladas en la posición 3. En todas ellas el ácido graso de 28 carbonos está esterificado al grupo acilo en la posición 2' pero no siempre está acilado con el residuo de β -hidroxibutirato (Figs. 3B y 3C).

El lípido A de *R. leguminosarum* parece ser igual al de *R. etli* ya que en ambas especies se han identificado varias de las enzimas que modifican el precursor Kdo₂-Lípido IV_A hasta el lípido A descrito en *R. etli* (ver más adelante).

Recientemente se ha caracterizado el lípido A de *Rhizobium* sp. Sin-1, una cepa relacionada a *R. galegae* y por

lo tanto filogenéticamente distante de *R. etli* y *R. leguminosarum*.²¹ A semejanza de *R. etli*, se aislaron varias moléculas relacionadas que difieren en el patrón de acilación (Fig. 3D). Todas carecen de grupos fosfato y poseen el mismo ácido graso de cadena extra larga que *R. etli* y *R. leguminosarum*, pero éste no presenta una sustitución con β -hidroxibutirato. A diferencia del lípido A sintetizado en las otras especies de *Rhizobium*, todas las moléculas de *Rhizobium* sp. Sin-1 presentan el residuo de GlcNato reemplazando a la GlcN proximal, ninguna posee GalA y dos de las moléculas determinadas no presentan acilación en la posición 3'.

Urbanik-Sypniewska et al. (1989) caracterizaron el lípido A de *S. meliloti* como un disacárido de GlcN bifosforilado como en enterobacterias, y tetra-acilado. Uno de estos grupos acilo correspondió al ácido graso 27-OH C28:0 hallado también en *Rhizobium*, sin embargo éste fue asignado como grupo primario esterificado a la GlcN proximal. Estudios más recientes sugieren que esta estructura debe ser reevaluada (comparar con el párrafo siguiente).⁴⁹

La estructura del lípido A del LPS rugoso de *Sinorhizobium* sp. NGR234 ha sido recientemente determinada.²⁰ Como en *Rhizobium*, se detectaron diferentes moléculas relacionadas. El 94% de las moléculas presentaron un disacárido de GlcN bifosforilado y tetra- o penta-acilado (Fig. 3F). Si bien no fue caracterizado muy detalladamente, el lípido A del LPS liso presentó además moléculas triaciladas. El ácido graso extra largo fue asignado como grupo secundario en la misma posición que en las moléculas de lípido A de *Rhizobium*. Se determinó que 30% de estos ácidos grasos extra largos son de 30 carbonos (29-OH C30:0).

Completando el panorama dentro de la familia Rhizobiaceae, el año pasado se determinó la estructura del lípido A de *A. tumefaciens* C58.⁵⁰ Como se esperaba, el análisis reveló una mezcla de moléculas que variaban en el patrón de acilación. Las moléculas más abundantes constan de un disacárido de GlcN, bifosforilado, penta-acilado, con el mismo ácido graso extra largo y en la misma posición que en los otros géneros de la familia (Fig. 3E).

Al comparar las estructuras descritas en Rhizobiaceae se observa una gran heterogeneidad en los patrones de acilación (Figs. 3B-3F). Gran parte de esta heterogeneidad se encuentra en la unidad proximal del disacárido. En general, el patrón de acilación es diferente al que presenta el arquetípico lípido A de enterobacterias. En Rhizobiaceae sólo hay un derivado aciloxi-acil, unido por un enlace amida a la GlcN distal. Este derivado contiene un ácido graso hidroxilado extra largo que es típico de toda la familia Rhizobiaceae y también está presente en otras bacterias simbióticas o patógenas, como *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bruceella* y *Legionella*.³ Todas estas bacterias pertenecen a la sub-

[§] La cepa CE3 es una derivada resistente a estreptomycin de la cepa tipo de *R. etli* CFN42.

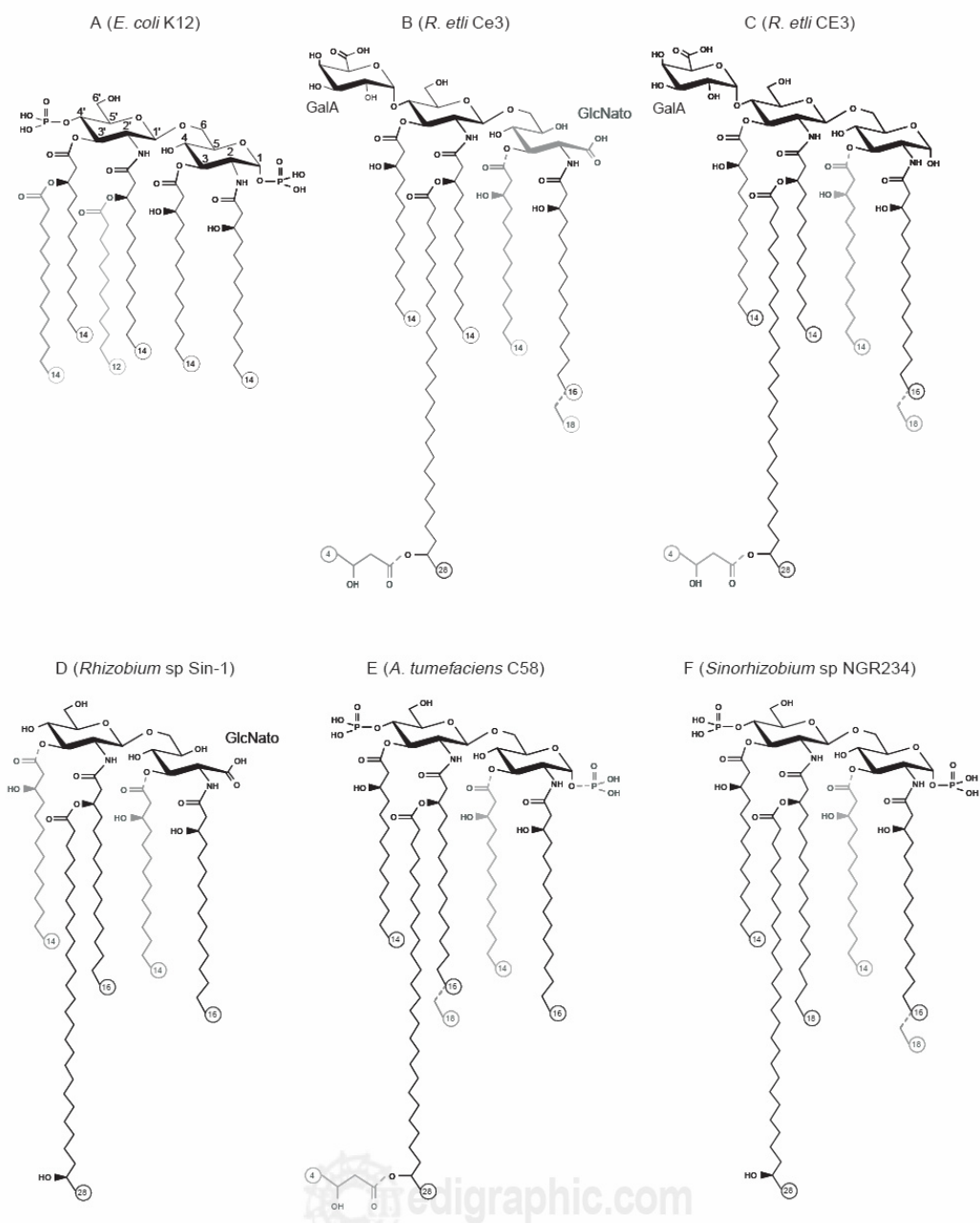


Figura 3. Estructura del lípido A en *E. coli* K12 (A) y de las más abundantes moléculas de lípido A producidas por algunos miembros de la familia Rhizobiaceae (B-F). Los números dentro de los círculos indican la longitud de los grupos acilo. En la estructura de *E. coli* se indica la numeración de los carbonos del disacárido y se señalan en gris los grupos acilos secundarios que dan lugar a derivados aciloxi-acil. En las estructuras de Rhizobiaceae se señalan en gris las sustituciones que diferencian las moléculas de lípido A producidas por cada cepa.

división α -2 de las Proteobacterias y tienen la capacidad de vivir intracelularmente en hospederos eucariontes. Se ha especulado sobre el papel de este ácido graso en la interacción entre estas bacterias y sus hospederos proponiendo que podría estabilizar la membrana externa, y así proteger ante las respuestas de defensa del hospedero o durante el estrés ácido u osmótico que probablemente enfrenten en los compartimientos intracelulares.^{49,52}

Oligosacárido núcleo

Este dominio de los LPS es el que ha sido estudiado con menos detalle a nivel estructural. Hasta la fecha sólo se han determinado las estructuras completas de dos ON en Rhizobiaceae.

La primera estructura resuelta completamente correspondió a la cepa CE3 de *R. etli* (Fig. 4A).¹⁴ La molécula consta de tres residuos de Kdo, tres de GalA, uno de Man y uno de Gal. Está unido al lípido A mediante uno de los Kdo y otro de estos residuos ocupa la posición terminal en donde se une el antígeno O (Fig. 4A). Los ON descritos en Enterobacteriaceae poseen grupos fosfato. Se ha propuesto que las cargas negativas de los grupos fosfato permiten unir las moléculas de LPS mediante cationes divalentes, y

así estabilizar la membrana externa.¹⁸ El ON de *R. etli* no posee grupos fosfato, sin embargo la función de éstos la asumirían los grupos carboxilo de los residuos de GalA. Asimismo, la ausencia de grupos fosfato en el ON sería una estrategia para economizar fósforo en ambientes como el suelo donde este elemento puede ser escaso.

Cuando los LPS de *R. etli* se someten a una lisis ácida suave, se liberan un trisacárido y un tetrasacárido que corresponden al ON.²⁷ Se han identificado productos de lisis idénticos en varias cepas de *R. leguminosarum* biovar *vi-ciae* y *trifolii*, por lo que se presume que el ON está conservado entre ambas especies.¹⁴ Apoyando esta asunción, se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra el ON de *R. leguminosarum* reconocen los LPS de *R. etli*. Los LPS de *R. tropici*, *A. tumefaciens*, y *Sinorhizobium* spp. no fueron reconocidos por estos anticuerpos por lo que sus ON deben ser diferentes.³⁴

Si bien no se ha determinado la estructura del ON de alguna cepa de *Sinorhizobium*, sí se ha determinado la composición de azúcares en cepas de *S. meliloti* y *S. fredii* (Tabla 1). Todas poseen Kdo, Glc, Gal, GlcA y GalA. La mayoría tienen Man y algunas tienen DHA. A diferencia de *Rhizobium*, el LPS rugoso es la forma más abundante producida por *Sinorhizobium* spp., y por este motivo el

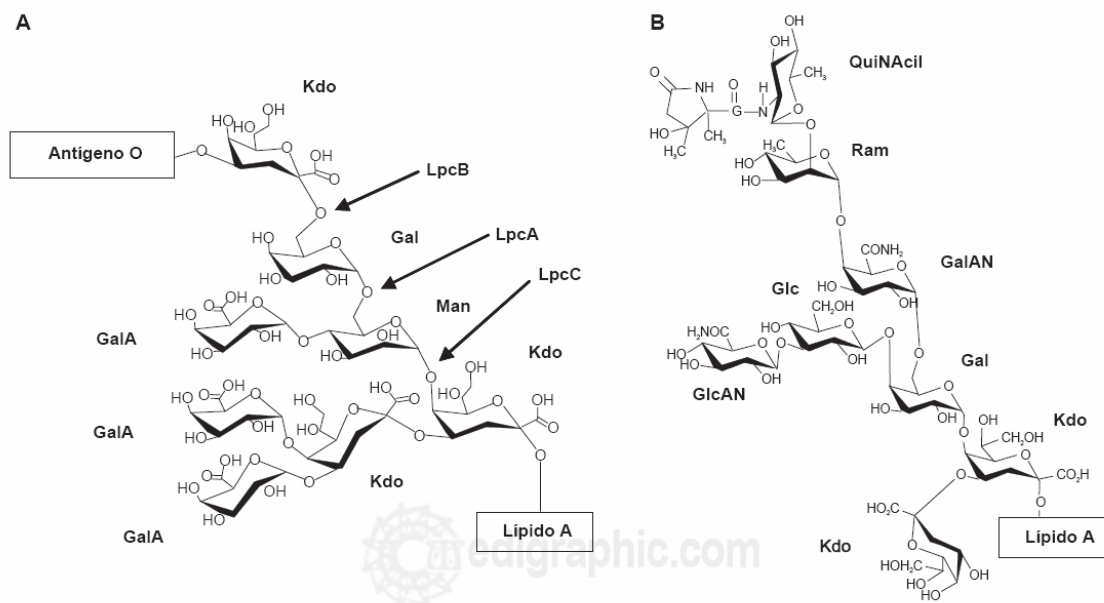


Figura 4. Estructuras de los ON de *R. etli* y *R. leguminosarum* (A) y *A. larrymoorei* (B). En la estructura de *R. etli* se indican las enzimas que catalizan las adiciones de Man, Gal y del Kdo terminal. GalAN, amida de GalA; GlcAN, amida de GlcA; QuiNAcil, quinovosomanina sustituida por un derivado de ácido piroglutámico.

principal determinante antigénico de sus LPS corresponde al ON.^{7,47} Se han identificado cuatro serogrupos entre los LPS de *Sinorhizobium* spp. que parecen corresponder a diferentes estructuras de ON que se diferencian por el contenido de ácidos urónicos.⁴⁷

Recientemente se ha determinado la estructura del ON de una cepa de *Agrobacterium larrymoorei* que sólo produce LPS rugoso.³⁶ Esta especie está relacionada con *A. tumefaciens* y causa tumores aéreos en *Ficus benjamina*. La estructura determinada contiene azúcares encontrados en otros ON de Rhizobiaceae como Kdo, Gal y Glc (Fig. 4B). Por otro lado presenta algunas diferencias: contiene Ram, los ácidos urónicos están presentes como uronamidas, por lo que no proveen cargas negativas, y el residuo

distal es una quinovosamina sustituida con un derivado de ácido piroglutámico que sólo se había descrito antes en el ON de *Campylobacter coli*.³⁶

Antígeno O

Esta es la parte más variable de la molécula de LPS. Esta variabilidad surge por la naturaleza, el orden y los enlaces de los diferentes azúcares que lo componen. También pueden presentarse sustituciones, como metilaciones y acetilaciones, que añaden complejidad a la molécula.²⁷ Hasta hace muy poco sólo se conocían las estructuras de la unidad repetida del antígeno O en cepas de *Rhizobium*, sin embargo recientemente se han descrito las estructuras de

Tabla 1. Azúcares presentes en los ON de cepas de *Sinorhizobium*.

Cepa	Glc	Gal	Kdo	DHA	Man	GlcA	GalA	Xil	Referencia
<i>S. meliloti</i> 102F51	+	+	+	+	-	+	+	-	Russa <i>et al.</i> , 1996
<i>S. meliloti</i> 1021*	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs <i>et al.</i> , 1998
<i>S. meliloti</i> 1021*	+	+	+	+	+	+	+	+	Campbell <i>et al.</i> , 2002
<i>S. fredii</i> USDA205	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs <i>et al.</i> , 1998
<i>S. fredii</i> USDA257	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs <i>et al.</i> , 1998
<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234	+	+	+	-	+	+	+	-	Reuhs <i>et al.</i> , 1998

* Se utilizaron diferentes métodos de extracción y purificación del ON.

Tabla 2. Estructuras de la unidad repetida del antígeno O en Rhizobiaceae.

Especie/Cepa	Estructura	Referencia
<i>R. leguminarum</i> bv. <i>viciae</i> 128C53	3)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2) ↑ α -D-Man-(1	Kannenberg <i>et al.</i> , 1998
bv. <i>trifolii</i> 4S	3)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 3)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 2) ↑ α -D-ManNAc-(1	Wang & Hollingsworth, 1994
<i>R. etli</i> CE3	4)- β -D-6-O-Me-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2) ↑ α -3-O-Me6dTal-(1	Forsberg <i>et al.</i> , 2000
<i>R. tropici</i> CIAT899	4)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -D-2-O-Ac-D-6dTal-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)	Gil Serrano <i>et al.</i> , 1995
<i>A. tumefaciens</i> F1	3)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4) 4)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 2)	De Castro <i>et al.</i> , 2004
DSM 30205	3)- α -D-Ara-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)	De Castro <i>et al.</i> , 2002
C58	3)- α -L-6dTal-(1 \rightarrow (acetilado al azar en C-4)	De Castro <i>et al.</i> , 2003

varias cepas de *A. tumefaciens* (Tabla 2). La unidad repetida puede ser un monosacárido o un oligosacárido de hasta 5 residuos que pueden ser azúcares comunes como Glc, Ara y Man, sin embargo es muy común la presencia de desoxihexosas y aminoazúcares. Como se mencionó anteriormente, pocas cepas de *Sinorhizobium* producen moléculas de LPS con antígeno O, lo que explica que se haya prestado poca atención a su estudio.

Adicionalmente a la unidad repetida, el antígeno O de *R. etli* CE3 contiene el trisacárido no repetido $\rightarrow 3$ - α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Man-(1 \rightarrow 3)- β -QuiNAc.¹⁵ Este trisacárido une el antígeno O al ON y, algunas veces, se le denomina ON externo. Asimismo, el antígeno O de esta cepa termina en un residuo de fucosa trimetilada (TOMFuc).¹⁵ Se presume que los antígenos O de otros Rhizobiaceae pueden tener estas estructuras adicionales a la unidad repetida, sin embargo hasta la fecha no se han descrito.

BIOSÍNTESIS

Lípido A

En vista de que el lípido A es esencial para casi todas las bacterias Gram negativas, no es sorprendente que el proceso de su biosíntesis esté muy conservado.^{45,46} En un elegante trabajo de bioquímica, Price *et al.* (1994) demostraron que *R. leguminosarum* y *R. etli* poseen las actividades enzimáticas que en *E. coli* se requieren para sintetizar el precursor Kdo₂-Lípido IV_A. Si bien no se han descrito estas actividades en otras Rhizobiaceae, los genomas de *S. meliloti* 1021 y *A. tumefaciens* C58 contienen los posibles ortólogos que codifican para estas enzimas (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Los pasos metabólicos posteriores presentes en Rhizobiaceae modifican el Kdo₂-Lípido IV_A hasta el lípido A maduro típico de estas bacterias. Varios de estos pasos han sido descritos recientemente en *R. leguminosarum* y *R. etli*.

Como se mencionó anteriormente, una gran parte de la heterogeneidad en las acilaciones del lípido A en Rhizobiaceae se centra en la unidad proximal del disacárido. En todas las especies analizadas, una proporción de las moléculas carecen del grupo acilo en la posición 3 (Figs. 3B-F). Se ha identificado la actividad enzimática responsable de esta deacilación en *R. leguminosarum*.¹ Esta actividad está asociada a membrana y al parecer actúa sobre el lípido A antes de que se forme el derivado aciloxi-acil. No se detectó esta actividad en extractos de *S. meliloti*, sin embargo esta especie debe poseer una actividad similar.

El segundo paso específico de Rhizobiaceae parece ser la acilación del precursor con el ácido graso extra largo.

La enzima que cataliza esta reacción, LpxXL, está asociada a la membrana interna y utiliza como donador de grupo acilo a una ACP específica codificada por el gen *acpXL*.^{2,6} Las dos proteínas están codificadas por genes cercanos pero no contiguos. Entre ambos genes se encuentran 4 ORFs, tres de los cuales codifican para proteínas que probablemente están involucradas en la biosíntesis del ácido graso de cadena extra larga. Los genomas de *S. meliloti* y *A. tumefaciens* poseen ortólogos a todos estos genes, lo que concuerda con la presencia en estas especies del ácido graso extra largo.

Recientemente se han obtenido mutantes de *S. meliloti* en los genes *acpXL*^{49,13} y *lpxXL*.¹³ Estas mutantes no incorporan el ácido graso extra largo en el lípido A, son más sensibles *in vitro* a estrés osmótico, ácido y a detergentes, presentan una menor competitividad y un retardo en la inducción de la nodulación en comparación a las cepas silvestres. Sin embargo, los nódulos tienen una morfología normal y fijan nitrógeno. Estos resultados sugerirían que si bien el ácido graso extra largo es importante, no es indispensable para establecer una simbiosis efectiva. Resultados similares se han obtenido en *R. leguminosarum* con el gen *acpXL*,⁵² sin embargo en este caso se determinó que un pequeño porcentaje de moléculas de lípido A portaban el ácido graso extra largo. En *R. leguminosarum* bv. *viciae* se ha demostrado que la concentración del ácido graso extra largo aumenta durante la simbiosis.^{26,52} Estos resultados podrían indicar que existe otra u otras ACP que no se expresan considerablemente en vida libre pero sí durante la simbiosis y que podrían sustituir la función de la ACP mutada. Por este motivo sería interesante determinar el porcentaje de moléculas de lípido A que porta el ácido graso extra largo en los bacteroides de *R. leguminosarum*. Otro punto a analizar en estas mutantes es si el ON y el antígeno O están alterados, ya que podría suceder que las enzimas que sintetizan estos componentes no reconozcan de la misma forma a moléculas que no porten el ácido graso extra largo.

Una característica típica del lípido A en *Rhizobium* es que no está fosforilado. En los extractos celulares de *R. leguminosarum* y *R. etli* se han identificado actividades enzimáticas que defosforilan los extremos 1 y 4' del precursor Kdo₂-Lípido IV_A.^{5,39} El gen de *R. leguminosarum* que codifica para la fosfatasa que actúa sobre la posición 1 ha sido clonado y caracterizado.²⁸ La enzima, denominada LpxE, actúa normalmente luego de que se ha añadido el ácido graso extra largo. En base a la secuencia de aminoácidos se predice que LpxE posee seis hélices transmembranales y que su probable sitio activo se orienta hacia el lado periplasmático de la membrana interna. Los homólogos más similares a LpxE se encuentran en los genomas de *S. meliloti* y *A. tumefaciens*.²⁸ En

estas especies sólo una proporción de las moléculas de lípido A no poseen grupos fosfatos en el extremo 1 por lo que será interesante determinar en qué etapa biosintética actúan estas fosfatasa, y si su expresión o actividad es inducida bajo alguna condición especial.

Otra característica del lípido A en *Rhizobium* es la presencia de un residuo de GlcNato en lugar de la GlcN proximal (Figs. 3B y 3D). Recientemente se ha clonado y caracterizado el gen de *R. leguminosarum* que codifica para una oxidasa que da origen a este residuo.^{43,44} La proteína, denominada LpxQ, se localiza en la membrana externa. No se han detectado homólogos a esta proteína en *S. meliloti*, lo que concuerda con la ausencia de GlcNato en esta especie. Por el contrario, el genoma de *A. tumefaciens* C58 codifica para una proteína 59% idéntica y 77% similar a LpxQ que puede oxidar el lípido A *in vitro*. Este ortólogo podría estar activo sólo bajo ciertas condiciones ya que no se ha detectado GlcNato en *A. tumefaciens* cultivado en condiciones de laboratorio.

Oligosacárido núcleo

Los dos primeros residuos del ON, que casi siempre son dos moléculas de Kdo, se añaden durante la biosíntesis del precursor Kdo₂-Lípido IV_A.⁴⁶ La presencia de estos residuos es necesaria para completar las acilaciones del lípido A y también uno de ellos actúa como el aceptor sobre el que se añaden secuencialmente el resto de azúcares del ON. Las enzimas que sintetizan los nucleótido azúcares precursores y las glucosiltransferasas que los ensamblan son proteínas membranales o asociadas a la membrana interna.¹⁸ Cuando se ha completado el ensamblaje del lípido A - ON, el transportador de tipo ABC MsbA, transloca la molécula al lado periplasmático de la membrana interna.⁴⁶ En varias cepas de Enterobacteriaceae se han identificado todas las enzimas necesarias para la biosíntesis del ON, mientras que en Rhizobiaceae se han descrito todos los pasos metabólicos sólo en *R. leguminosarum*.

El primer paso específico en la biosíntesis del ON en *R. leguminosarum* es catalizado por LpcC. Esta proteína es una manosiltransferasa que utiliza GDP-manosa como donador del azúcar y el Kdo interno del Kdo₂-Lípido A como aceptor (Fig. 4A).²³ Posteriormente actúan las enzimas LpcA y LpcB que presentan actividad de galactosil- y Kdo-transferasa, respectivamente (Fig. 4A).²² Los genes *lpcA* y *lpcB* están contiguos en el genoma de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 mientras que el gen *lpcC* está separado por aproximadamente 10 kb.

Recientemente se ha descrito la identificación de una región del genoma de *R. leguminosarum* que dirige la síntesis de tres actividades enzimáticas capaces de añadir residuos hidrofílicos a las moléculas Kdo₂-Lípido IV_A y ma-

nosa- Kdo₂-Lípido IV_A.²⁵ La secuencia de dicha región reveló tres ORFs similares al gen *arnT* de *E. coli*, que codifica para una enzima involucrada en la transferencia de aminoarabinosa al lípido A. El análisis de los productos obtenidos indica que estos ORFs codifican las glucosiltransferasas requeridas para añadir los tres residuos de GalA presentes en el ON de *R. leguminosarum* (Fig. 4A).

En *S. meliloti* se ha identificado un gen homólogo a *lpcC* de *R. leguminosarum*.²⁹ Este gen, denominado *lpsB*, codifica para una proteína que puede manosilar moléculas de Kdo₂-Lípido IV_A. Sin embargo, a diferencia de *lpcC* también puede añadir otros azúcares. Es interesante notar que *lpsB* puede complementar a mutantes en *lpcC* pero no ocurre lo contrario.²⁴ Estos datos sugieren que en *S. meliloti*, LpsB no añade Man al Kdo del lípido A sino otro azúcar. Será interesante determinar la estructura del ON en *S. meliloti* para determinar qué residuo es añadido *in vivo* por LpsB. Otros tres genes (*lpsCDE*) que codifican para posibles glucosiltransferasas están contiguos a *lpsB* pero se transcriben divergentemente.²⁹ No se han determinado las especificidades de estas probables glucosiltransferasas. Sin embargo, parece ser que están involucradas en la biosíntesis del ON, ya que el LPS rugoso de mutantes en estos genes migra más rápido que el de la cepa silvestre. Esto se ha interpretado como la producción de un ON truncado.

No existen reportes sobre genes involucrados en la biosíntesis del ON en agrobacterias. Sin embargo, *A. tumefaciens* C58 posee un homólogo muy similar a *lpcC* y *lpsB* que está anotado como una posible manosiltransferasa del ON. Este gen está precedido de *greA* y está cercano a *lrp*. Esta misma organización genética está conservada en *R. leguminosarum* y *S. meliloti*, lo que podría sugerir que se trata de un ortólogo con función similar.²⁹

Antígeno O

La biosíntesis del antígeno O ocurre en el lado citoplasmático de la membrana interna.⁴⁶ Como sucede durante la biosíntesis del ON, se requieren enzimas que sintetizen los nucleótidos azúcares precursores y glucosiltransferasas que los ensamblen. La cadena del antígeno O crece unida al aceptor undecaprenil fosfato que está unido a la membrana. Al finalizar la síntesis de una unidad de antígeno O o del antígeno O completo, un transportador transloca esta molécula al lado periplasmático de la membrana interna. Si se han transportado unidades, éstas son polimerizadas por la enzima Wzy. Finalmente, una ligasa se encarga de unir el antígeno O al lípido A - ON para completar una molécula de LPS.⁴⁶

Se han identificado varios genes o grupos de genes que están involucrados en la biosíntesis del antígeno O en varias cepas de *Rhizobium*. La mayoría de estos genes sólo es-

tán anotados como probables enzimas que sintetizan nucleótido azúcares o probables glucosiltransferasas ya que es difícil inferir funciones específicas en base a sus secuencias. Tomando ventaja de que se conoce la estructura completa del LPS de *R. etli* CE3, recientemente se han caracterizado algunas proteínas cuyas funciones están directamente relacionadas con la biosíntesis de su antígeno O.^{12,16,30,32}

Como se mencionó anteriormente, un trisacárido no repetido es parte del antígeno O de *R. etli* CE3.¹⁵ El residuo de QuiNAc proximal de este trisacárido une el antígeno O al ON. En la mutante CE166 sólo una parte de las moléculas de LPS poseen antígeno O.¹⁶ Estas moléculas completas de LPS se diferencian de las producidas por la cepa silvestre en que el residuo de QuiNAc está reemplazado por 2-acetomida-2,6-dideoxihexosil-4-ulosa. Este residuo es un intermediario en la biosíntesis de QuiNAc. El gen mutado en CE166 fue denominado *lpsQ* y las evidencias indican que codifica para la reductasa que transforma el intermediario en QuiNAc. Se presume que la glucosiltransferasa que añade QuiNAc también puede reconocer y añadir el intermediario pero con menos eficiencia. Esto explicaría porqué sólo una porción de los LPS en la mutante tienen antígeno O.

En Enterobacteriaceae se han descrito dos mecanismos para el transporte del antígeno O al lazo periplasmático de la membrana interna.⁴⁶ Uno de ellos involucra a la flipasa Wzx y el otro a un transportador de tipo ABC codificado por los genes *wzm* y *wzt*. Lerouge *et al.* (2001) identificaron en *R. etli* CE3 genes homólogos a los que codifican el transportador ABC. Los LPS de una mutante en el gen homólogo a *wzm* mostraron sólo la banda de LPS rugoso, no reaccionaron con anticuerpos que reconocen el antígeno O de la cepa silvestre y sólo presentaron los azúcares componentes del ON. Recientemente hemos identificado en nuestro laboratorio genes homólogos a *wzm* y *wzt* en *R. tropici* CIAT899.⁴⁰ Una mutante en *wzt* produce sólo LPS rugoso y es sensible a varios antibióticos, xenobióticos y estreses abióticos como se ha descrito en mutantes deficientes en antígeno O. No hemos podido identificar homólogos claros de *wzm-wzt* en los genomas de *R. leguminosarum* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum/) y de *A. tumefaciens* C58 lo que podría indicar que el mecanismo del transportador ABC no es común a todas las Rhizobiaceae.

El antígeno O de *R. etli* CE3 presenta metilaciones en los residuos de GlcA y 6dTal (Tabla 1) y en el residuo terminal TOMFuc.¹⁵ Recientemente se ha descrito una probable metiltransferasa que parece estar involucrada en la modificación de alguno de los residuos de la unidad repetida.³² El gen está ubicado corriente arriba de los genes *wzm-wzt*. La mutante deficiente en este gen sólo produce LPS rugoso con un ON intacto. Esto sugiere que la metilación se produce a nivel del nucleótido azúcar precursor y que ésta es necesaria para el en-

samblaje del antígeno O. Duelli *et al.* (2001) han descrito el gen *lpeA* que codifica para una probable metiltransferasa que afecta al residuo terminal TOMFuc. Corriente abajo de *lpeA* se identificaron otros dos ORFs con similitudes a metiltransferasas. Las evidencias indican que las proteínas codificadas por estos genes participan en las metilaciones del residuo de Fuc terminal y que estas modificaciones son necesarias para su incorporación al antígeno O, ya que mutantes en estos genes producen LPS sin este residuo terminal.

CONCLUSIONES

Varios estudios han identificado genes que probablemente estén involucrados en la biosíntesis de LPS en Rhizobiaceae. Sin embargo, no se han asignado funciones específicas a la mayoría de estos genes. Idealmente, se requieren ensayos bioquímicos para determinar la función de muchas de las enzimas involucradas. No obstante, también se pueden realizar inferencias sólidas sobre la función en base a los defectos estructurales presentados por las mutantes en estos genes. Los avances recientes en la determinación de las estructuras completas de varios dominios de los LPS en varias cepas de Rhizobiaceae abren muchas posibilidades para determinar las funciones de los genes identificados hasta la fecha y los que se identificarán en el futuro. Asimismo, pronto se liberarán las secuencias de los genomas de *R. etli* CFN42 y *R. leguminosarum* 3841, cuyos LPS han sido extensamente estudiados. Indudablemente, las comparaciones entre estos genomas y los ya secuenciados de Rhizobiaceae y de otras bacterias, contribuirán al avance en esta interesante área.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la Dra. Esperanza Martínez-Romero por su invaluable apoyo y aliento en la realización de los trabajos experimentales que motivaron la realización de esta revisión, y a la Dra. Isabel López Lara por leer el manuscrito y por sus acertadas sugerencias.

REFERENCIAS

1. Basu, S. S., K. A. White, N. L. Que & C. R. Raetz. 1999. A deacylase in *Rhizobium leguminosarum* membranes that cleaves the 3-O-linked beta-hydroxymyristoyl moiety of lipid A precursors. *J. Biol. Chem.* 274:11150-8.
2. Basu, S. S., M. J. Karbarz & C. R. H. Raetz. 2002. Expression cloning and characterization of the C28 acyltransferase of lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Biol. Chem.* 277:28959-71.
3. Bhat, U. R., H. Mayer, A. Yokota, R. I. Hollingsworth & R. W. Carlson. 1991. Occurrence of lipid A variants with 27-hydroxyoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 173:2155-9.

4. Bhat, U. R., L. S. Forsberg & R. W. Carlson. 1994. Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* lipopolysaccharide. Unique nonphosphorylated lipid A containing 2-amino-2-deoxygluconate, galacturonate, and glucosamine. *J. Biol. Chem.* 269:14402-10.
5. Brozek, K. A., J. L. Kadrmaz & C. R. Raetz. 1996a. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. Novel enzymes that process precursors containing 3-deoxy-D-mannoctulosonic acid. *J. Biol. Chem.* 271:32112-8.
6. Brozek, K. A., Carlson R. W. & C. R. Raetz. 1996b. A special acyl carrier protein for transferring long hydroxylated fatty acids to lipid A in *Rhizobium*. *J. Biol. Chem.* 271:32126-36.
7. Campbell, G. R., B. L. Reuhs & G. C. Walker. 2002. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:3938-43.
8. Campbell, G. R., L. A. Sharypova, H. Scheidle, K. M. Jones, K. Niehaus, A. Becker & G. C. Walker. 2003. Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J. Bacteriol.* 185:3853-62.
9. De Castro, C., O. De Castro, A. Molinaro & M. Parrilli. 2002. Structural determination of the O-chain polysaccharide from *Agrobacterium tumefaciens*, strain DSM 30205. *Eur. J. Biochem.* 269:2885-8.
10. De Castro, C., E. Bedini, R. Nunziata, R. Rinaldi, L. Mangoni & M. Parrilli. 2003. Elucidation of the O-chain structure from the lipopolysaccharide of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. *Carbohydr. Res.* 338:1891-4.
11. De Castro, C., A. Carannante, R. Lanzetta, R. Nunziata, V. Piscopo & M. Parrilli. 2004. Elucidation of two O-chain structures from the lipopolysaccharide fraction of *Agrobacterium tumefaciens* F/1. *Carbohydr. Res.* 339:2451-5.
12. Duelli, D. M., A. Tobin, J. M. Box, V. S. Kolli, R. W. Carlson & K. D. Noel. 2001. Genetic locus required for antigenic maturation of *Rhizobium etli* CE3 lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 183:6054-64.
13. Ferguson, G. P., A. Datta, R. W. Carlson & G. C. Walker. 2005. Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 56:68-80.
14. Forsberg, L. S. & R. W. Carlson. 1998. The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 273:2747-57.
15. Forsberg, L. S., U. R. Bhat & R. W. Carlson. 2000. Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. A unique O-acetylated glycan of discrete size, containing 3-O-methyl-6-deoxy-L-talose and 2,3,4-tri-O-methyl-L-fucose. *J. Biol. Chem.* 275:18851-18863.
16. Forsberg, L. S., K. D. Noel, J. Box & R. W. Carlson. 2003. Genetic locus and structural characterization of the biochemical defect in the O-antigenic polysaccharide of the symbiotically deficient *Rhizobium etli* mutant, CE166. Replacement of N-acetylquinosamine with its hexosyl-4-ulose precursor. *J. Biol. Chem.* 278:51347-59.
17. Frayssé, N., F. Couderc & V. Poinot. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380.
18. Frirdich, E. & C. Whitfield. 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J. Endotoxin Res.* 11:133-144.
19. Gil-Serrano, A. M., I. Gonzalez-Jimenez, P. Tejero Mateo, M. Bernabe, J. Jimenez-Barbero, M. Megias & M. J. Romero-Vazquez. 1995. Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Carbohydr. Res.* 275:285-94.
20. Gudlavalleti, S. K. & L. S. Forsberg. 2003. Structural characterization of the lipid A component of *Sinorhizobium* sp. NGR234 rough and smooth form lipopolysaccharide. Demonstration that the distal amide-linked acyloxyacyl residue containing the long chain fatty acid is conserved in *Rhizobium* and *Sinorhizobium* sp. *J. Biol. Chem.* 278:3957-68.
21. Jeyaretnam, B., J. Glushka, V. S. Kumar Kolli & W. Carlson. 2002. Characterization of a novel lipid A from *Rhizobium* species Sin-1. A unique lipid A structure that is devoid of phosphate and has a glycosyl backbone consisting of glucosamine and 2-aminogluconic acid. *J. Biol. Chem.* 277:41802-41810.
22. Kadrmaz, J. L., D. Allaway, R. E. Studholme, J. T. Sullivan, C. W. Ronson, P. S. Poole & C. R. Raetz. 1998. Cloning and overexpression of glycosyltransferases that generate the lipopolysaccharide core of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Biol. Chem.* 273:26432-40.
23. Kanipes, M. I., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter & C. R. Raetz. 2003. A mannosyl transferase required for lipopolysaccharide inner core assembly in *Rhizobium leguminosarum*. Purification, substrate specificity, and expression in *Salmonella waaC* mutants. *J. Biol. Chem.* 278:16356-64.
24. Kanipes, M. I., S. R. Kalb, R. J. Cotter, D. F. Hozbor, A. Lagares & C. R. Raetz. 2003. Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortholog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. Role of the lipopolysaccharide core in symbiosis of Rhizobiaceae with plants. *J. Biol. Chem.* 278:16365-71.
25. Kanjilal, S., Basu, S. S., Kanipes, M. I. & Raetz C. R. H. 2005. Origin of the galacturonic acid modifications to the inner core of *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharides. En: *Memorias del XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. p. 185. Mérida, Mexico.
26. Kannenberg, E. L. & R. W. Carlson. 2001. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol. Microbiol.* 39:379-91.
27. Kannenberg, E. L., B. L. Reuhs, L. S. S. Forsberg & R. W. Carlson. 1998. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions. En: *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
28. Karbarz, M. J., S. R. Kalb, R. J. Cotter, C. R. H. Raetz. 2003. Expression cloning and biochemical characterization of a *Rhizobium leguminosarum* lipid A 1-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 278:39269-39279.
29. Lagares, A., D. F. Hozbor, K. Niehaus, A. J. Otero, J. Lorenzen, W. Arnold & A. Puhler. 2001. Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* 183:1248-58.
30. Lerouge, I., T. Laeremans, C. Verreth, J. Vanderleyden, C. Van Soom, A. Tobin & R. W. Carlson. 2001. Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an *lps* mutant deficient in O-antigen. *J. Biol. Chem.* 276:17190-8.
31. Lerouge, I. & J. Vanderleyden. 2002. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:17-47.
32. Lerouge, I., C. Verreth, J. Michiels, R. W. Carlson, A. Datta, M. Y. Gao & J. Vanderleyden. 2003. Three genes encoding for putative methyl- and acetyltransferases map adjacent to the *wzm* and *wzt* genes and are essential for O-antigen biosynthesis in *Rhizobium etli* CE3. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16:1085-93.

33. Lloret, L. & E. Martínez-Romero. 2005. Evolución y filogenia de rhizobia. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47: 43-60.
34. Lucas, M. M., J. L. Peart, N. J. Brewin & E. L. Kannenberg. 1996. Isolation of monoclonal antibodies reacting with the core component of lipopolysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 and mutant derivatives. *J. Bacteriol.* 178:2727-2733.
35. Metts, J., J. West, S. H. Doares & A. G. Matthyse. 1991. Characterization of three *Agrobacterium tumefaciens* avirulent mutants with chromosomal mutations that affect induction of vir genes. *J. Bacteriol.* 173:1080-1087.
36. Molinaro, A., C. De Castro, R. Lanzetta, M. Parrilli, A. Raio & A. Zoia. 2003. Structural elucidation of a novel core oligosaccharide backbone of the lipopolysaccharide from the new bacterial species *Agrobacterium larymoorei*. *Carbohydr. Res.* 338:2721-2730.
37. Neihardt, F.C., J.L. Ingraham & M. Schaechter. 1990. Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach. Sinauer Associates, Sunderland.
38. Price, N. P. J., T. M. Kelly, C. R. H. Raetz & R. W. Carlson. 1994. Biosynthesis of a structurally novel lipid A in *Rhizobium leguminosarum*: identification and characterization of six metabolic steps leading from UDP-GlcNAc to 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid₁-lipid IV_A. *J. Bacteriol.* 176:4646-4655.
39. Price N. P., B. Jeyaretnam, R. W. Carlson, J. L. Kadmas, C. R. Raetz, K. A. Brozek. 1995. Lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: role of a 2-keto-3-deoxyoctulosonate-activated 4' phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:7352-7356.
40. Ormeño-Orrillo, E. & E. Martínez-Romero. 2004. Effect of mutations in LPS biosynthetic genes on the resistance of *Rhizobium tropici* to the fungicide captan. En: *Memorias del 10th International Congress on Microbial Ecology*. p. 90. Cancun, Mexico.
41. Que, N. L. S., S. Lin, R. J. Cotter & C. R. H. Raetz. 2000. Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont *Rhizobium etli*. Demonstration of a conserved distal unit and a variable proximal portion. *J. Biol. Chem.* 275:28006-28016.
42. Que, N. L. S., A. A. Ribeiro & C. R. H. Raetz. 2000. Two dimensional NMR spectroscopy and structures of six lipid A species from *Rhizobium etli* CE3. Detection of an acyloxyacyl residue in each component and origin of the aminogluconate moiety. *J. Biol. Chem.* 275:28017-28027.
43. Que-Gewirth, N. L., S. Lin, R. J. Cotter & C. R. H. Raetz. 2003. An outer membrane enzyme that generates the 2-amino-2-deoxy-gluconate moiety of *Rhizobium leguminosarum* lipid A. *J. Biol. Chem.* 278:12109-19.
44. Que-Gewirth N. L., M. J. Karbarz, S. R. Kalb, R. J. Cotter, C. R. Raetz. 2003. Origin of the 2-amino-2-deoxy-gluconate unit in *R. leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. *J. Biol. Chem.* 278:12120-9
45. Raetz, C. R. H. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:129-170.
46. Raetz, C. R. H. & C. Whitfield. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71:635-700.
47. Reuhs, B. L., D. P. Geller, J. S. Kim, J. E. Fox, V. S. Kolli & S. G. Pueppke. 1998. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4930-4938.
48. Russa, R., M. Bruneteau, A. S. Shashkov, T. Urbanik-Sypniewska & H. Mayer. 1996. Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* strain 102F51 and its nonnodulating mutant WL113. *Arch. Microbiol.* 165:26-33.
49. Sharypova, L. A., K. Niehaus, H. Scheidle, O. Holst & A. Becker. 2003. *Sinorhizobium meliloti* *acpXL* mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 278:12946-54.
50. Silipo, A., C. De Castro, R. Lanzetta, A. Molinaro & M. Parrilli. 2004. Full structural characterization of the lipid A components from the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 lipopolysaccharide fraction. *Glycobiology.* 14:805-15.
51. Urbanik-Sypniewska, T., U. Seydel, M. Greck, J. Weckesser & H. Mayer. 1989. Chemical studies on the lipopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* 10406 and its lipid A region. *Arch. Microbiol.* 152:527-532.
52. Vedam, V., E. L. Kannenberg, J. G. Haynes, D. J. Sherrer, A. Datta & R. W. Carlson. 2003. A *Rhizobium leguminosarum* AcpXL mutant produces lipopolysaccharide lacking 27-hydroxyoctacosanoic acid. *J. Bacteriol.* 185:1841-50.
53. Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr & H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:89-103.
54. Wang, Y. & R. I. Hollingsworth. 1994. The structure of the O-antigenic chain of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4s. *Carbohydr. Res.* 260:305-17.

Correspondencia:

Ernesto Ormeño-Orrillo
 Centro de Ciencias Genómicas,
 Universidad Nacional Autónoma de México.
 Tel.: +52 777 3131697
 Fax.: +52 777 3175581
 E-mail: eormeno@ccg.unam.mx



OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este estudio fueron los siguientes:

- Identificar loci involucrados en la biosíntesis de lipopolisacáridos en *R. tropici* CIAT899.
- Caracterizar genéticamente los loci identificados.
- Establecer el efecto de mutaciones que produzcan defectos estructurales en lipopolisacáridos en la colonización de la rizósfera y raíz de maíz por *R. tropici* CIAT899.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo:

“Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899”

Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899

Ernesto Ormeño-Orrillo,¹ Monica Rosenblueth,¹ Ellen Luyten,² Jos Vanderleyden² and Esperanza Martínez-Romero^{1*}

¹Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

²Centre of Microbial and Plant Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 20, 3001 Heverlee, Belgium.

Summary

Three transposon mutants of *Rhizobium tropici* CIAT899 affected in lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis were characterized and their maize rhizosphere and endophytic root colonization abilities were evaluated. The disrupted genes coded for the following putative products: the ATPase component of an O antigen ABC-2 type transporter (*wzt*), a nucleotide-sugar dehydratase (*lpsβ2*) and a bifunctional enzyme producing GDP-mannose (*noeJ*). Electrophoretic analysis of affinity purified LPS showed that all mutants lacked the smooth LPS bands indicating an O antigen minus phenotype. In the *noeJ* mutant, the rough LPS band migrated faster than the parental band, suggesting a truncated LPS core. When inoculated individually, the *wzt* and *noeJ* mutants colonize the rhizosphere and root to a lower extent than the parental strain while no differences were observed between the *lpsβ2* mutant and the parental strain. All mutants were impaired in competitive rhizosphere and root colonization. Pleiotropic effects of the mutations on known colonization traits such as motility and growth rate were observed, but they were not sufficient to explain the colonization behaviours. It was found that the LPS mutants were sensitive to the maize antimicrobial 6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA). Only the combined effects of altered growth rate and susceptibility to maize antimicrobials could account for all the observed

colonization phenotypes. The results suggest an involvement of the LPS in protecting *R. tropici* against maize defence response during rhizosphere and root colonization.

Introduction

Rhizobia are best known as the nodule-inducing bacterial symbionts of legume plants. However, an increasing number of studies are uncovering their lifestyles as rhizosphere inhabitants and as endophytes of several plant families. Various rhizobial species and strains are able to colonize the rhizosphere or the interior of wheat (Sabry *et al.*, 1997), cultivated and wild rice (Yanni *et al.*, 1997; Chaintreuil *et al.*, 2000), barley and canola (Lupwayi *et al.*, 2004), maize (Chabot *et al.*, 1996; Gutierrez-Zamora and Martínez-Romero, 2001), *Arabidopsis* (Stone *et al.*, 2001) and poplar (Doty *et al.*, 2005). Plant growth promotion has been reported in several cases opening the possibility to use rhizobia as inoculants for non-legume plants. Rhizobia have the advantage in that they have been safely used as plant inoculants in agriculture over a period of more than 100 years (Gutierrez-Zamora and Martínez-Romero, 2001).

Rhizobium tropici CIAT899 was isolated from a common bean nodule but has a broad legume host range (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Hernandez-Lucas *et al.*, 1995; Acosta-Duran and Martínez-Romero, 2002). Recently, we have found that CIAT899 is a good maize rhizosphere and root endophytic colonizer, promoting growth and being as competitive as *Rhizobium etli* Ch24–10, one of the best maize endophytes (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004). It appears that *R. tropici* strains are well adapted to endophytic colonization as they have been isolated inside poplar trees as well (Doty *et al.*, 2005). CIAT899 is highly resistant to acid soil conditions and to aluminum (Graham *et al.*, 1994; Vinuesa *et al.*, 2003), and it is tolerant to salinity, high temperatures and heavy metals (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Riccillo *et al.*, 2000). These characteristics make it a useful strain to be used as inoculant under environmental stress conditions (Bernal *et al.*, 2004). *Rhizobium tropici* strains are successfully used as bean inoculants in Brazil (Hungria *et al.*, 2000). As bean and maize are intercropped

Received 6 September, 2007; accepted 22 November, 2007.
*For correspondence. E-mail emartine@ccg.unam.mx; Tel. (+52) 7773291692; Fax (+52) 7773175581.

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd

by small farmers in Brazil (M. Hungria, pers. comm.) *R. tropici* could be used as inoculant for both crops.

The potential environmental benefits of using plant growth promoting (PGP) bacteria to reduce the use of agrochemicals have encouraged research directed to identify traits required for a successful rhizosphere or endophytic root colonization (Lugtenberg *et al.*, 2001). Several molecular determinants involved in this process have been identified by the analysis of colonization impaired mutants. Most studies on this topic have focused on fluorescent pseudomonads, with work reported also on *Enterobacter cloacae* (Lohrke *et al.* 2002; Roberts *et al.*, 2006), *Azospirillum brasilense* (Jofre *et al.*, 2004), *Azoarcus* (Dorr *et al.*, 1998; Reinhold-Hurek *et al.*, 2006), and recently on *Burkholderia vietnamensis* (O'Sullivan *et al.* 2007). On the contrary, nothing is known about rhizobial factors required for rhizosphere or root colonization of non-legume plants.

The lipopolysaccharides (LPS) are complex glycolipids, which are the major components of the external leaflet of the outer membrane (OM) of Gram-negative bacteria. They can be divided in three structural regions: the lipid A that anchors the LPS to the OM, the core which is a short oligosaccharide attached to the lipid A, and a distal polysaccharide known as the O antigen (Raetz and Whitfield, 2002). Given its location, the LPS are important for the interaction with the environment and eukaryotic hosts. In microbe-plant interactions, several roles have been proposed for the LPS. In the rhizobia-legume association, they may act as communication signals, they can mask bacterial cell surface components that can be detrimental to the symbiosis, contribute to cell surface adaptation for optimal cell-cell contact within the symbiosome, or be a protective barrier against plant antimicrobials (Lerouge and Vanderleyden, 2002; Becker *et al.*, 2005). The latter has been suggested as well as a function of LPS during plant-pathogen interactions (Newman *et al.*, 2001). In the highly specialized symbiosis between *Sinorhizobium meliloti* and *Medicago*, the LPS are involved in the suppression of plant defence responses (Scheidle *et al.*, 2005; Tellstroem *et al.*, 2007).

A role for the LPS during rhizosphere and endophytic root colonization of different crops by PGP bacteria has been suggested by studies performed on *Pseudomonas fluorescens* and *A. brasilense*. O antigen minus mutants of several biocontrol strains of *P. fluorescens* showed reduced colonization and the same was reported for an *A. brasilense* mutant with an altered LPS core (Simons *et al.*, 1996; Duijff *et al.*, 1997; Dekkers *et al.*, 1998; Jofre *et al.*, 2004). However, these mutants showed pleiotropic effects that could account for their impaired colonization. While the *Pseudomonas* mutants had reduced growth rates, the *A. brasilense* mutant was affected in exopolysaccharide (EPS) production. Nevertheless, a

Pseudomonas mutant with a shortened O antigen did not have pleiotropic effects but still showed reduced competitiveness, pointing to a direct role of LPS in colonization (Dekkers *et al.*, 1998). The defective phenotype was observed on tomato, radish and wheat suggesting a non-host-specific function of the LPS.

We identified three *R. tropici* mutants with LPS defects and found that they were affected in maize rhizosphere and root endophytic colonization. By analysing the genetic nature of the mutations and considering pleiotropic effects but also possible direct roles of the LPS we aimed at understanding the involvement of LPS in maize colonization by *R. tropici* CIAT899.

Results

Identification of LPS defective mutants

Auto-agglutination in unshaken liquid medium is a common phenotype displayed by rhizobia with LPS defects (de Maagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989; Garcia-de los Santos and Brom, 1997). Three *R. tropici* mutants, designated CIAT899-E1, CIAT899-E2 and CIAT899-E3, showing this phenotype, were identified by screening a transposon mutant library (Fig. S1).

The LPS from the parental and mutant strains were extracted with the proteinase K and hot phenol-water methods, resolved by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of SDS, and silver stained. The extract obtained from the parental strain by the proteinase K method produced a LPS profile showing a low molecular weight (LMW) band and a series of high molecular weight (HMW) bands in a ladder-like pattern (Fig. 1A). Comparisons with known LPS profiles from rhizobia and other bacteria suggested that the LMW band corresponded to the rough LPS (lipid A plus core) and the HMW bands to the smooth LPS (complete LPS molecules with different number of attached O antigen units) (Carlson, 1984; Vinuesa *et al.*, 1999). The mutants did not produce the smooth LPS bands and showed an accumulation of a rough LPS band with the same (CIAT899-E1 and CIAT899-E2) or higher (CIAT899-E3) electrophoretic mobility than the parental band (Fig. 1A).

When the LPS were extracted with the hot phenol-water procedure, the parental rough LPS band was recovered in the water phase while the smooth LPS bands appeared mainly in the phenol phase (Fig. 1B), consistent with the use of this latter phase as the starting material for the isolation and structural characterization of the *R. tropici* CIAT899 O antigen by Gil-Serrano and colleagues (1995). The phenol phase of all mutants lacked any stainable material in concordance with an O antigen minus phenotype (Fig. 1B). The rough LPS bands from mutants CIAT899-E1 and CIAT899-E2 showed the same partition-

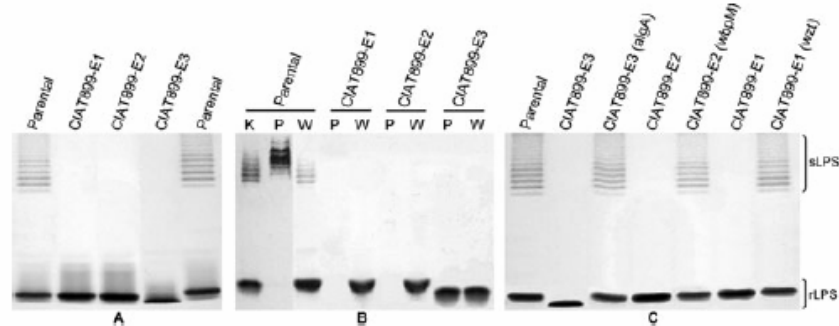


Fig. 1. Silver-stained PAGE profiles of the LPS present in the proteinase K (A), hot phenol-water extracts (B) or affinity purified material (C) of the *R. tropici* parental strain, its LPS mutants or complemented mutants. In B, extracts from the phenol (P) or water (W) phase are indicated above lanes together with a proteinase K extract (K) for comparison. sLPS, smooth LPS; rLPS, rough LPS.

ing behaviour as the parental band (Fig. 1B). In contrast, the corresponding band from mutant CIAT899-E3 partitioned in both phases (Fig. 1B). The higher electrophoretic mobility and different partitioning behaviour of the CIAT899-E3 rough band, together with the genetic evidence (see below), suggest that it represents a rough LPS with a truncated core.

To confirm that the bands detected by silver staining correspond to LPS molecules, affinity purification was performed as described by Valverde and colleagues (1997). This method uses the specific interaction between polymyxin B and the lipid A portion of the LPS. When the affinity-purified material was visualized by silver staining, the same bands previously observed were detected for the parental and mutant strains, confirming that they represent LPS molecules (Fig. 1C).

R. tropici CIAT899 EPS mutants are known to produce non-gummy colonies (Milner *et al.*, 1992). In contrast, the mutants identified here were as gummy as those produced by the parental strain in PY, YEM and minimal media (MM) (Fig. S2A). Additionally, the mutants and parental strain showed similar fluorescent intensities under UV when grown on PY containing calcofluor (Fig. S2B) indicating normal production of succinoglycan-like EPS (Gil-Serrano *et al.*, 1990; Andrade *et al.*, 2002). Gel fixation with Alcian Blue prior to silver staining, a method used to visualize acidic capsular polysaccharides (Corzo *et al.*, 1991), did not reveal any difference between the mutants and parental strain (data not shown).

The *R. tropici* derivatives were symbiotically defective when inoculated on common bean plants. CIAT899-E3 did not induce nodulation, while CIAT899-E1 and CIAT899-E2 induced the formation of scattered, small, Fix⁻ pseudonodules. These phenotypes are similar to those reported for *R. etli* LPS mutants in common bean (Noel *et al.*, 1984; Garcia-de los Santos and Brom, 1997; Lerouge *et al.*, 2001). In contrast, EPS mutants of

CIAT899 are known to induce the formation of normal and Fix⁺ nodules (Milner *et al.*, 1992).

Genetic characterization of the LPS mutants

Blots of restricted total DNA hybridized with a labelled *gusA* probe showed single transposon insertions in all mutants (data not shown). A fragment of the transposon along with *R. tropici* DNA flanking the *gusA* border was cloned from each mutant and partially sequenced.

In CIAT899-E1, the transposon disrupted a gene similar to *wzt* from several bacteria (Table 1). These genes code for the ATPase component of ABC-2 type transporters which translocate the O antigen from the cytoplasmic face of the inner membrane to the periplasmic face where it is ligated to the lipid A-core (Raetz and Whitfield, 2002). A cosmid restoring normal nodulation of common bean was isolated and shown by polymerase chain reaction (PCR) to contain the same genetic region cloned from mutant CIAT899-E1 (data not shown). Partial sequencing of this cosmid revealed the complete *wzt* gene (1359 nt) and an 831 nt-long ORF upstream of *wzt* with an 11 nt overlap (Fig. 2). The *in silico* translated product of the second ORF was similar to proteins known as Wzm which correspond to the transmembrane components of the O antigen ABC transporters (data not shown). A partially sequenced ORF (402 nt) was identified downstream of *wzt* (Fig. 2). The putative product was similar to β -glycosyltransferases present in O antigen gene clusters of other bacteria (data not shown).

Sequencing of the region flanking the transposon in CIAT899-E2 revealed that the transposon disrupted an ORF whose *in silico* translated product was highly similar (> 84%) to LpsB from *Rhizobium leguminosarum* 3841 and to Lps β 2 from *R. etli* CFN42, both implicated in O antigen biosynthesis (Table 1, Fig. 2) (Garcia-de los Santos and Brom, 1997; Young *et al.*, 2006). The ORF

Table 1. Similarity of the products of the genes disrupted in the *R. tropici* mutants with homologous proteins as determined with the BLASTx program.

Mutant (length of sequence compared)	Similar protein/organism	Identity/similarity (%)	E ^a	Product	Accession number
CIAT899-E1 (1359 nt)	<i>Wzt/Raoultella terrigena</i> ATCC 33257	37/53	3e-65	Putative ATP-binding protein of ABC transport system ^b	AAQ82930
	<i>Wzt/Klebsiella pneumoniae</i>	38/54	8e-64	ATP-binding protein of ABC-2 type transport system ^b	AAN06493
	<i>Wzt/Serratia marcescens</i> N28b	36/54	9e-63	putative ATP-binding protein of ABC transport system ^b	AAC00182
	<i>Wzt/Escherichia coli</i> F492	35/53	4e-56	ATP-binding component of ABC transporter ^a	BAA28325
	<i>Wzt/Rhizobium etli</i> CE3	38/53	7e-52	ATP-binding component of ABC transporter ^c	AAK51165
CIAT899-E2 (1913 nt)	<i>LpsB/Rhizobium leguminosarum</i> 3841	72/85	0	Putative dTDP-glucose 4,6-dehydratase	CAE00204
	<i>Lpsβ2/Rhizobium etli</i> CFN42	72/84	0	Putative dTDP-glucose 4,6-dehydratase	AAB66669
	<i>WbpM/Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	51/67	1e-158	UDP-GlcNAc C ₆ dehydratase/ C4 reductase	AAC45867
CIAT899-E3 (624 nt)	<i>NoeJ/Rhizobium tropici</i> CIAT899	100/100	3e-92	Putative mannose-1-phosphate guanylyltransferase	CAC38770
	<i>NoeJ/Rhizobium etli</i> CFN42	82/93	2e-99	Putative mannose-1-phosphate guanylyltransferase	ABC92008
	<i>NoeJ/Sinorhizobium</i> sp. NGR234	67/82	6e-78	Putative mannose-1-phosphate guanylyltransferase	AAB91607
	<i>ManC/Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	56/73	5e-61	Putative GDP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase	BAC51184
	<i>AceF/Gluconacetobacter xylinus</i> C1	52/67	5e-56	Phosphomannose isomerase/ mannose-1-phosphate guanylyltransferase	CAA72316
	<i>AlgA/Pseudomonas aeruginosa</i>	51/70	2e-54	Phosphomannose isomerase/ mannose-1-phosphate guanylyltransferase	AAA25972

- a. Expect value reported by the BLASTx program.
b. Located inside an O antigen biosynthetic gene cluster.
c. Located inside the LPS α region.

disrupted in CIAT899-E2 was named *lpsβ2* because of its similarity to and functional complementation by the CFN42 gene (see below). The most similar protein with known function was WbpM from *Pseudomonas aeruginosa* an enzyme-producing UDP-D-acetylquinosamine (UDP-D-QuiNAc) from UDP-N-acetylglucosamine (UDP-

GlcNAc), and essential for the biosynthesis of the B-band O antigen in some *P. aeruginosa* serotypes (Creuzenet and Lam, 2001). No other ORF was detected in the sequenced 100 nt upstream region of the CIAT899 *lpsβ2* gene.

Mutant CIAT899-E3 had an insertion in a gene coding for a protein similar to phosphomannose isomerase (PMI) known as NoeJ, ManC, AceF or AlgA in different Gram-negative bacteria (Table 1). These enzymes belong to the type II PMIs which, in addition to the PMI activity, have guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase (GMP) activity. Different domains in the protein code for these functions which are required in non-consecutive steps in the biosynthesis of the GDP-D-mannose used for mannosylation of surface polysaccharides (Jensen and Reeves, 1998). The position of the transposon insertion (Fig. 2) suggests that this mutant produces an incomplete protein with a partial GMP and no PMI domain. The two most similar proteins with experimentally tested function were AceF from *Gluconacetobacter xylinus* and AlgA from *P. aeruginosa* (Table 1). Because of the Nod⁻ phenotype of CIAT899-E3 the interrupted gene was named *noeJ*. Nogales and colleagues (2002) reported a Nod⁻ CIAT899

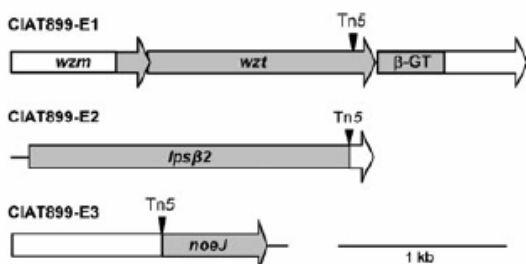


Fig. 2. Genetic organization of the regions disrupted in the *R. tropici* LPS mutants. The site of transposon (Tn5) insertion is indicated. The shaded areas represent the sequenced regions submitted to GenBank. The lengths of the partially sequenced ORFs were assumed to be equal to the most similar genes in the GenBank database according to BLAST searches. β-GT, β-glycosyltransferase.

Table 2. Maize rhizosphere and endophytic root colonization by the *R. tropici* parental strain, its LPS mutants and complemented mutants.

Strain	Log ₁₀ (cfu g ⁻¹ fresh weight)	
	Rhizosphere	Root
CIAT899	9.7 ± 0.4 a	5.5 ± 0.3 a
CIAT899-E1	8.8 ± 0.2 c	4.8 ± 0.2 c
CIAT899-E2	9.6 ± 0.3 a	5.4 ± 0.2 a
CIAT899-E3	8.6 ± 0.2 c	4.9 ± 0.1 c
CIAT899-E1 (<i>wzf</i>)	9.4 ± 0.2 b	5.4 ± 0.3 a
CIAT899-E2 (<i>wbpM</i>)	9.2 ± 0.4 b	5.2 ± 0.1 b
CIAT899-E3 (<i>algA</i>)	9.6 ± 0.3 a	5.3 ± 0.1 a

Data are presented as means ± SD. Numbers in the same column followed by different letters are significantly different at $P = 0.05$ according to Duncan's multiple-range test. Similar results were obtained in two independent experiments performed with five replicates per treatment. Data from one experiment are shown.

transposon mutant with an insertion in a partially sequenced gene with 100% identity to the sequence obtained from CIAT899-E3 but its LPS was not analysed. The ATG start codon of a partially sequenced ORF was found 183 nt downstream of the *noeJ* gene. The *in silico* translated product showed significant similarities with putative transglutaminase-like proteins of undefined function (Makarova *et al.*, 1999).

Effects of LPS defects on maize rhizosphere and root colonization

To evaluate the influence of the LPS defects on colonization, the bacterial numbers recovered from the rhizosphere (including the rhizoplane) and the root interior of maize plants 2 weeks after inoculation were determined. To test whether the sonication treatment used to liberate bacteria from the root has any effect on viability, mid log cultures were suspended in sterile water to 10⁵ cfu ml⁻¹ and sonicated for 15 min (three times longer than the treatment used in the colonization experiments). No effects on viability were observed for the parental strain or mutants (as shown in Table S1).

Higher bacterial numbers were recovered from the rhizosphere than from the root interior in agreement with previous reports for *R. tropici* and other endophytic bacteria (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004; 2006). In experiments where each strain was inoculated individually, CIAT899-E1 and CIAT899-E3 were recovered from both compartments at significantly lower numbers when compared with the parental strain (Table 2). In contrast, no significant difference was observed between the colonization of CIAT899-E2 and the parental strain (Table 2).

All mutants were significantly impaired in competitive root colonization with the parental strain when coinoculated in a 1:1 ratio (Fig. 3). CIAT899-E1 and CIAT899-E3

constituted only 4.9% or 4.3% and 9.7% or 7.1% of the bacteria recovered from the rhizosphere or root interior, respectively. Mutant CIAT899-E2 also showed a diminished competitiveness, albeit not as severe as the other mutants, representing 25.8% and 27.1% of the total bacteria in the rhizosphere and root, respectively (Fig. 3).

The lower recovery of the LPS mutants could not be attributed to their auto-agglutination as phase-contrast microscopic observations showed that our routine homogenization of the bacterial suspensions by vortexing (four 15 s intervals at maximum speed) was sufficient to disaggregate the clumps (data not shown). The same approach was used by others that reported reduced root colonization by clumping *Rhizobium* mutants (Araujo *et al.*, 1994). Additionally, sonication performed during the

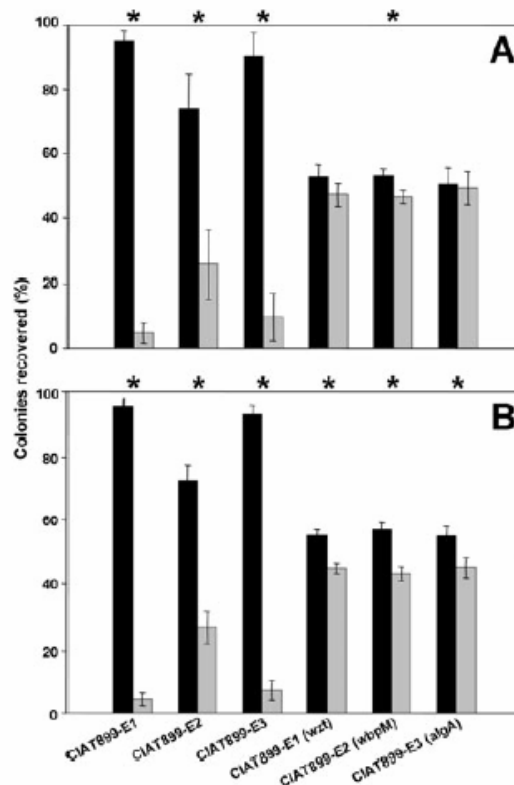


Fig. 3. Competitive maize rhizosphere (A) and root endophytic (B) colonization by the *R. tropici* LPS mutants and complemented strains in 1:1 coinoculation experiments with the parental strain. Results are shown as means ± SD of the percentage of recovered colonies. Grey bars represent values from the mutants or complemented mutants, while black bars represent the corresponding values for the parental strain. Similar results were obtained in two independent experiments performed with five replicates per treatment. Data from one experiment are shown. Asterisks indicate significant differences at $P = 0.05$ between the competing strains based on Log cfu g⁻¹ of fresh weight.

Table 3. Susceptibility to antimicrobials expressed as the minimal inhibitory concentration (MIC), and swimming motility of the *R. tropici* parental strain, its LPS mutants and complemented mutants.

Strain	MIC					Motility ^a (mm)
	Novobiocin ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Captan ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	SDS (%)	MBOA (mg ml^{-1})	Polymyxin B ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
CIAT899	8	75	> 0.125	> 0.25	> 105	17.2 \pm 0.2 a
CIAT899-E1	7.5	50	0.075	0.25	35	15 \pm 0.3 c
CIAT899-E2	7.5	50	0.075	0.25	35	15.2 \pm 0.3 c
CIAT899-E3	6	25	0.0125	0.18	20	15.3 \pm 0.4 c
CIAT899-E1 (<i>wzt</i>)	8	75	> 0.125	> 0.25	> 105	16.1 \pm 0.2 b
CIAT899-E2 (<i>wbpM</i>)	8	75	> 0.125	> 0.25	> 105	16.4 \pm 0.4 b
CIAT899-E2 (<i>lpsB2</i>)	8	75	> 0.125	> 0.25	> 105	16.3 \pm 0.4 b
CIAT899-E3 (<i>algA</i>)	8	75	> 0.125	> 0.25	> 105	16.5 \pm 0.5 b

a. Data are presented as means \pm SD. Numbers in the same column followed with different letters are significantly different at $P = 0.05$ according to Duncan's multiple-range test.

The same MIC values were obtained in at least two independent experiments. Similar motilities were observed in three independent experiments. Data from one experiment are presented.

extraction of bacteria could contribute to clump dispersion (Falcioni *et al.*, 2006).

The mutants show increased sensitivity to some antibiotics including a maize antimicrobial compound

The LPS are important as a protective barrier against hydrophobic and lipophilic antimicrobial compounds, and to detergents (Nikaido, 2003). Thus, the minimal inhibitory concentration (MIC) of the hydrophobic antibiotic novobiocin, the lipophilic captan fungicide [*N*-(trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide], and the SDS detergent was determined. Captan was included because it is commonly used as a maize seed dressing to protect against fungal pathogens but is often detrimental to bacteria as well (Bernal *et al.*, 2004). Additionally, the susceptibility to the cationic antimicrobial peptide polymyxin B was evaluated. The mutants showed higher sensitivities to all the compounds in comparison to the parental strain (Table 3). CIAT899-E1 and CIAT899-E2, affected only in O antigen biosynthesis, had the same levels of sensitivity while CIAT899-E3, which appears to be affected also in core integrity, showed the highest level of susceptibility. These results suggest an increased accessibility of all the compounds to the cell as the LPS structure becomes shorter. No differences were observed between the mutants and parental strain in their sensitivities to ampicillin and streptomycin, antibiotics which do not interact with LPS and traverse the OM by porin channels (data not shown).

Besides captan, it is unlikely that the above mentioned compounds occur in the rhizosphere or roots but plants do produce antimicrobials in response to microbial invaders. Maize synthesizes heterocyclic benzoxazinones as secondary metabolites having antifungal and antibacterial activities (Niemeyer, 1988). 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), the primary benzoxazinone

produced by maize, is unstable and quickly decomposes to the more stable 6-methoxy-2-benzoxazinone (MBOA) which also has antimicrobial activity (Corcuera *et al.*, 1978). To explore if the inability to cope with maize antimicrobials was contributing to the colonization impaired phenotypes of the LPS mutants, we evaluated their sensitivity to MBOA. At 0.1 mg ml^{-1} , MBOA reduced the growth of the parental strain (not shown) and LPS mutants, but had a greater deleterious effect on the latter (Fig. 4). As observed for the previously tested antimicrobials, CIAT899-E1 and CIAT899-E2 behaved similarly, while mutant CIAT899-E3 was more sensitive. The growth of the mutants was completely inhibited by 0.25 mg ml^{-1} of MBOA while the parental strain was still able to grow (Table 3). The effect of hydrogen peroxide, a general plant antimicrobial and signaling molecule was also evaluated. The mutants and the parental strain were equally sensi-

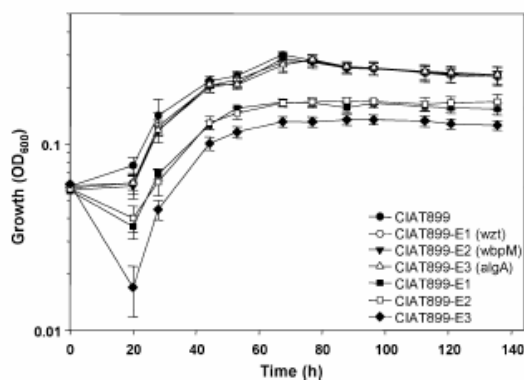


Fig. 4. Effect of the maize antimicrobial MBOA at 0.1 mg ml^{-1} on the growth of the *R. tropici* parental strain, its LPS mutants and complemented strains. Data are presented as OD_{600} means \pm SD. The experiments were performed two times giving similar results. The data presented correspond to one experiment.

Table 4. Generation times (g) of the *R. tropici* parental strain and its LPS mutants in PY medium.

Strain	g (hr ⁻¹) determined by	
	OD ₅₀₀	cfu ml ⁻¹
CIAT899	2.81 ± 0.02 a	5.34 ± 0.03 a
CIAT899-E1	2.97 ± 0.06 b	5.86 ± 0.04 b
CIAT899-E2	2.41 ± 0.03 c	4.86 ± 0.06 c
CIAT899-E3	2.74 ± 0.07 a	5.29 ± 0.02 a

Data are presented as means ± SD. Numbers in the same column followed with different letters are significantly different at $P=0.05$ according to Duncan's multiple-range test. Experiments were performed three times giving similar results. Data from one experiment are shown.

tive according to the disc diffusion method used, suggesting that the LPS are not involved in protection against this compound (data not shown). A recently published work on the *Azorhizobium caulinodans*–*Sesbania rostrata* interaction suggests that EPS are more likely involved in protection against hydrogen peroxide (D'Haese *et al.*, 2004).

The mutants show pleiotropic effects in some traits related to root colonization

The LPS defects are often correlated with reductions in motility (Priefer, 1989; Garcia-de los Santos and Brom, 1997) and sometimes in growth rate (de Maagd *et al.*, 1989; Dekkers *et al.*, 1998), traits known to play roles in rhizosphere and root colonization (Lugtenberg *et al.*, 2001). The *R. tropici* LPS mutants showed slight but significant reduction in swimming motilities in comparison to the parental strain (Table 3). Despite having a different LPS defect, no significant differences were observed in the diameter of the swimming haloes between CIAT899-E3 and the other mutants. Swarming motility could not be observed in the parental strain or mutants under the conditions tested (data not shown). No difference was observed between the growth rate of CIAT899-E3 and the parental strain in PY (Table 4), YEM and MM (data not shown). In contrast, CIAT899-E1 and CIAT899-E2 grew slower and faster, respectively, than the parental strain in all media tested (Table 4 and data not shown).

The behaviour of the mutants in other traits related to root colonization was also evaluated. Besides the differences in growth rate, all mutants could grow in MM with ammonium nitrate as sole nitrogen source, indicating that they were not auxotrophs. Qualitative assays did not reveal differences between the parental and mutants in vitamin requirements, in the utilization of the 49 carbon sources present in the API 50 CH gallery, or in the catabolism of glutamine, asparagine, alanine, glycine, serine, arginine and proline, which are the prevalent amino acids detected in maize root exudates (Krafczyk *et al.*, 1984).

Genetic complementation of the LPS mutants

The *R. tropici* CIAT899 wild-type *wzt* gene complemented CIAT899-E1 for the production of smooth LPS (Fig. 1C). *R. tropici* CIAT899 DNA cosmids complementing the nodulation phenotype of mutants CIAT899-E2 and CIAT899-E3 were isolated. These cosmids had distinct restriction patterns, contained the regions disrupted in the corresponding mutants as judged by PCR amplifications, and complemented the mutants for their LPS defective phenotypes (data not shown). Given that the genes disrupted in mutants CIAT899-E2 and CIAT899-E3 coded for putative enzymes we chose to perform heterologous complementation experiments with genes having experimentally confirmed function. The *P. aeruginosa* PAO1 *wbpM* gene complemented CIAT899-E2 for the production of smooth LPS bands having wild-type electrophoretic mobilities (Fig. 1C). As expected owing to its high similarity, the *R. etli* CFN42 *lpsB2* gene also complemented the LPS defects in this mutant (not shown). CIAT899-E3 was complemented for the production of a parental LPS profile by the *P. aeruginosa* PAO1 *algA* gene (Fig. 1C). The complemented mutants also recovered parental phenotypes for auto-agglutination and susceptibility to antimicrobials (Table 3, Fig. 4 and data not shown). The swimming motility was not fully restored to parental level but a significant increase was observed in comparison to the mutants (Table 3).

All the complemented mutants recovered the ability to induce the formation of well developed, nitrogen fixing nodules on common bean (not shown). When inoculated individually on maize, they showed the same or only slightly reduced abilities to colonize the rhizosphere and root in comparison to the parental strain (Table 2). In competition, the complemented CIAT899-E1 and CIAT899-E3 mutants showed the same competitiveness as the parental strain to colonize the rhizosphere (Fig. 3A). The complemented CIAT899-E2 mutant showed reduced competitiveness relative to the parental but it was higher than the mutant without *wbpM* (Fig. 3A). None of the complemented mutants reached the same numbers as the parental strain in the root interior but the introduction of the complementing genes resulted in an increase in their recovery in comparison to the mutants (Fig. 3B).

Discussion

The three *R. tropici* mutants with LPS defects were found to be negatively affected in maize rhizosphere and root endophytic colonization. Nevertheless, a direct correlation between the LPS defects and the colonization phenotypes could not be established. As a first step to untangle the involvement of LPS in maize colonization, we began by analysing the nature of the genetic lesions. The puta-

tive product of the mutated gene in CIAT899-E1, an O antigen transporter, was clearly related to its LPS phenotype (Lerouge *et al.*, 2001; Raetz and Whitfield, 2002). In CIAT899-E2, the functional complementation by the *P. aeruginosa wbpM* gene indicated that the *R. tropici lpsβ2* gene is involved in UDP-D-QuiNAc biosynthesis (Creuzenet and Lam, 2001). QuiNAc is the first O antigen sugar residue in *R. etli* CFN42 and *Burkholderia caryophylli* NCPP 2151 (Lerouge *et al.*, 2001; De Castro *et al.*, 2005). It is conceivable that a deficiency of this primer sugar would prevent O antigen biosynthesis. Supporting this notion, a *lpsβ2* mutant of *R. etli* CFN42 lacked the O antigen (García-de los Santos and Brom, 1997). Given the LPS phenotype of CIAT899-E2, it may be hypothesized that the CIAT899 LPS have QuiNAc in an equivalent position as the above-mentioned strains. The LPS of mutant CIAT899-E3 not only lacked the O antigen but also seems to have a truncated core. The putative function of the disrupted gene in this mutant and the functional complementation by the *algA* gene suggest that mannose, or a sugar derived from it, is required for the synthesis of the LPS core in *R. tropici* CIAT899. Actually, mannose is a sugar residue commonly present in the LPS core of rhizobia (Kannenberg *et al.*, 1998). The enzymatic function affected in CIAT899-E3 would also block O antigen biosynthesis given that GDP-D-mannose is a precursor for the biosynthesis of the GDP-D-talose and GDP-L-fucose, required as donors for two of the three sugar residues present in the O antigen repeating unit of CIAT899 (Gil-Serrano *et al.*, 1995; Maki and Renkonen, 2004).

We searched for pleiotropic effects of the mutations on several traits playing a role in plant colonization and found differences with the parental strain in motility and growth rate. In PGP *P. fluorescens*, non-motile as well as mutants with reduced motility are impaired in competitive colonization of the rhizosphere of several plants (Lugtenberg *et al.*, 2001). Motility is important for migration towards and along the root to niches where nutrients are exuded and thus contributes to an effective colonization of the root (de Weert *et al.*, 2002; Capdevila *et al.*, 2004). The three *R. tropici* LPS mutants showed equal levels of motility reduction relative to the parental strain, a factor likely contributing to their impaired colonization abilities but not explaining their distinct behaviours. Lipopolysaccharide defects are thought to influence swimming motility indirectly owing to alterations in the OM that interfere with flagella biogenesis or function (Abeyrathne *et al.*, 2005; Canals *et al.*, 2006). It is worth mentioning that the effects on motility were very mild in *R. tropici* when compared with the complete abolition of motility in LPS mutants of *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. *viciae* (de Maagd *et al.*, 1989; Priefer, 1989; García-de los Santos and Brom, 1997).

Dekkers and colleagues (1998) found a correlation between O antigen deficiency and reduced growth rate but this relationship was not discussed further. We found that the two *R. tropici* mutants with normal rough LPS but lacking O antigen showed altered growth rate but, unexpectedly, only CIAT899-E1 was a slow grower while CIAT899-E2 grew faster than the parental strain. These phenotypes were observed in all media tested, suggesting that they reflect a general metabolic effect similar to the one described in an adenylate cyclase mutant of *E. cloacae* that showed reduced growth rates in several media and was impaired in cucumber root colonization (Roberts *et al.*, 2006). In CIAT899-E1, O antigen units are likely being accumulated in the cytoplasmic face of the inner membrane owing to a non-functional *wzm-wzt* ABC transporter. Growth inhibitions have been observed in *wzm* and *wzt* mutants of *Escherichia coli* O8 and O9a (Cuthbertson *et al.*, 2005) probably caused by the sequestration of the undecaprenyl carriers or perturbation of membrane function as a result of the accumulation of O antigen units. It is possible that a similar effect is occurring in CIAT899-E1 resulting in a reduced growth rate. In CIAT899-E2, complementation by the *wbpM* gene suggests that the CIAT899 Lpsβ2 protein uses UDP-GlcNAc as substrate (Creuzenet and Lam, 2001). This nucleotide sugar is also used as an essential precursor for the biosynthesis of peptidoglycan and lipid A (Ramos-Aires *et al.*, 2004). It can be speculated that the reduced consumption of this key nucleotide sugar in CIAT899-E2 is causing a favourable carbon and energy balance that can boost growth rate. A fast growth could give a selective advantage for nutrient competition in the rhizosphere and root apoplast where the availability of photosynthate is a main limiting factor for growth (Simons *et al.*, 1996; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006). Interestingly, CIAT899-E2 was recovered in higher numbers than the other mutants, supporting the notion that a higher growth rate can be beneficial for root colonization.

Even when interacting with non-pathogenic bacteria, some plant defence mechanisms are activated (Azpillcueta *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005), and it has been suggested that defence responses could regulate colonization by these microorganisms (Iniguez *et al.*, 2005; Miche *et al.*, 2006). One major component of plant defence is the production of antimicrobial compounds (Castro and Fontes, 2005). Symbionts have to withstand potentially toxic concentrations of these molecules in order to successfully colonize plants (Eisenschenk *et al.*, 1994; Gonzalez-Pasayo and Martínez-Romero, 2000; D'Haese and Holsters, 2004). In maize, antimicrobial benzoxaninones are accumulated in plant tissues as low toxicity glycosides and are released by glucosidases in reaction to pathogens or tissue damage (Niemeyer, 1988). Nevertheless, active root exudation has been

reported in non-injured plants (Zhang *et al.*, 2000), and it is probable that field-grown maize plants liberate considerable amounts of benzoxazinones owing to stress factors that induce defence reactions, making it likely that these compounds affect *R. tropici* during its interaction with maize. Surface polysaccharides can provide protection against antimicrobials during microbial–plant interactions (D’Haeze and Holsters, 2004), and in particular, the LPS are well known as an effective barrier against hydrophobic and lipophilic molecules (Nikaido, 2003). Interestingly, maize benzoxazinones have a lipophilic character (Chiapusio *et al.*, 2004). Because the *R. tropici* LPS mutants were more sensitive to MBOA than the parental strain, it is possible that their impaired colonization was partly due to the inability of their altered LPS to properly exclude the maize benzoxazinones. Although we did not test for susceptibility towards maize antimicrobial peptides (Duvick *et al.*, 1992), the mutants were more sensitive to polymyxin B. Given that LPS are involved in resistance to these compounds, the *R. tropici* mutants may be also more sensitive to the antimicrobial peptides present in maize.

In some rhizobial-legume symbioses, cytological evidence for activation of plant defences have been described after inoculation with LPS mutants (Stacey *et al.*, 1991; Perotto *et al.*, 1994; Niehaus *et al.*, 1998). These observations suggest an alternative scenario for the involvement of maize defence mechanisms in which the *R. tropici* mutants may be eliciting an active plant defence response that affects colonization. In addition, their higher susceptibilities to maize antimicrobials may further limit their spread within maize tissues. We considered that this situation is unlikely because, when inoculated individually, all mutants reached high numbers in the rhizosphere (>log 8.6) and roots (>log 4.8). Lower numbers, especially within the root, may be expected if they were being recognized as pathogens thereby triggering complete plant defence responses. As a comparison, LPS mutants of bacterial pathogens not only show reduced virulence but their numbers in plant tissues rapidly decline (Newman *et al.*, 2001). The observations made for *R. tropici* are similar to those reported for an O antigen mutant of the biocontrol *P. fluorescens* WSC147r strain that colonized tomato roots to a lower extent than the wild type but did not induce a different defence response (Duijff *et al.*, 1997).

We conclude that the diminished colonization phenotypes of the *R. tropici* LPS mutants in comparison to the parental strain were caused by the effects of the mutations on susceptibility to maize antimicrobials, growth rate, and, to a less extent, on motility. The latter two represent pleiotropic effects while the first, reflecting the LPS function as a protective barrier, would indicate a direct role of the LPS in colonization. The combined effects of altered

growth rate and MBOA sensitivity explained the observed differences between the colonization behaviours of the mutants. It was interesting to find that the analysis of a single molecular trait supports the conclusion of Latour and colleagues (2004) that colonization has a multifactorial determinism.

Experimental procedures

Bacterial strains and culture conditions

R. tropici CIAT899cp is a spontaneous mutant of the wild-type CIAT899 strain (Martínez-Romero *et al.*, 1991) selected for higher resistance to fungicide Captan to be used as a common bean inoculant on Captan-dressed seeds. This strain was referred as the parental strain in this study. *R. tropici* were routinely grown in the complex PY medium at 30°C (Noel *et al.*, 1984). YEM (Vincent, 1970) and the MM described by Kingsley and Bohlool (1992) using 10 mM ammonium nitrate as nitrogen source were used for some tests. *Escherichia coli* strains were cultivated in Luria–Bertani medium at 37°C. The following antibiotics were added to the media when required ($\mu\text{g ml}^{-1}$): nalidixic acid (30), kanamycin (45), neomycin (60), gentamycin (10), carbenicillin (100) and tetracycline (7.5 for rhizobia, 10 for *E. coli*).

Molecular techniques

Transposon mutagenesis was performed with an mTn5*gusA-oriV-pgfp* (Rosconi *et al.*, 2006) using the procedures described by Xi and colleagues (1999). Lipopolysaccharide defective derivatives were identified by screening for mutants showing auto-agglutination in PY liquid medium. To clone the insertions, genomic DNA from each mutant was digested with XhoI, ligated and used to transform *E. coli* DH5 α . Plasmid DNA was isolated from the kanamycin-resistant colonies. The *R. tropici* DNA fragments adjacent to the transposon were sequenced using primer RH128 (Xi *et al.*, 1999) directed outwards from the 5' end of *gusA*. A primer walking strategy was used to extend the sequences further. ORF prediction was performed with GeneMark (Besemer and Borodovsky, 1999). Putative functions were assigned based on homology to proteins retrieved from the GenBank database with the BLASTX program, and on the presence of conserved domains detected with InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>).

For complementation *in trans*, fragments containing complete ORFs were PCR amplified from genomic DNA using the PfuUltra DNA polymerase. The following primer pairs were used (introduced restriction sites underlined): H91wzT (5'-ttttaagcttttcgacgttcttggcatctat-3') – wzT189B (5'-ttttggatcggatggcgtcaogaggga-3') for the *R. tropici* CIAT899 wild-type *wzT* gene, H240_lpsBeta2 (5'- ttttaagcttaagctcgttcgcgtaag-3') – lpsBeta2_54B (5'-ttttggatcctccgatattccctatggt-3') for the *R. etli* CFN42 *lps* β 2 gene using pAGS10 plasmid DNA as template (García-de los Santos and Brom, 1997), and H67wbpM (5'-tttaagcttggccatggtatctgt-3') – wbpM51B (5'-tttggatccccggaacatogta-3') and H28algA (5'-ttttaagcttcagacgcatcgctcaa-3') – algA83B (5'-ttttggatcggccaggaaagtcaatc-3') for the *P. aeruginosa* PAO1 *wbpM* and

algA genes, respectively. The PCR products were TA cloned into the pCR4-TOPO vector (Invitrogen) after addition of 3' A-overhangs by incubating the PCR reaction with Taq polymerase (Invitrogen) and 200 μ M dATP for 60 min at 72°C. The amplified genes were excised from the plasmids as HindIII-BamHI fragments, gel purified, and cloned into the broad host range vector pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995). The resulting plasmids were transferred into the mutants by triparental matings using a helper strain carrying the pRK2013 plasmid.

Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database under accession numbers DQ311659–DQ311661.

LPS isolation and analysis

Three different methods were used to isolate LPS: (i) the proteinase K method as described by Campbell and colleagues (2003) (ii) the hot phenol-water extraction procedure as modified for rhizobia by Carlson and colleagues (1978), and (iii) the affinity purification method developed by Valverde and colleagues (1997). Lipopolysaccharide extracts were subjected to 18% PAGE and visualized by silver staining (Hitchcock and Brown, 1983). To reveal acidic polysaccharides, gels were stained with Alcian Blue prior to silver staining (Corzo *et al.*, 1991).

Phenotypic characterization

Production of EPS was visually evaluated by observing gum production on solid media. Calcofluor-binding EPS were revealed by fluorescence under UV on media supplemented with 0.02% calcofluor. To evaluate motility, late log cultures ($OD_{600} = 0.8$) were inoculated at the centre of PY plates containing 0.3% or 0.6% agar for swimming or swarming motility, respectively. The plates were incubated for 3 days and the diameter of the growth zone was determined. Utilization of amino acids as sole nitrogen sources at 10 mM was evaluated in MM. Carbon source utilization was determined using the API 50 CH gallery as instructed by the manufacturer (Biomerieux). Sensitivity to hydrogen peroxide was tested by a disc diffusion assay spreading 10^8 cfu of mid log phase cultures ($OD_{600} = 0.4$) onto PY plates and placing filter paper discs saturated with increasing concentrations of hydrogen peroxide in the surface of the plate. After 3 days of incubation, the diameter of the inhibition zone was recorded. To test for sensitivity to other antimicrobial compounds, mid log phase cultures ($OD_{600} = 0.4$) were diluted in fresh PY and 20 μ l (10^4 cfu) was spotted onto PY plates containing different concentrations of polymyxin B, novobiocin, SDS, ampicillin, streptomycin or captan. The lowest concentration that completely inhibited growth was recorded as the MIC. To determine the effect of MBOA on growth, cultures were diluted to an $OD_{600} = 0.05$ in PY containing 0.1 or 0.25 mg ml⁻¹ MBOA, and the growth was spectrophotometrically recorded for 140 h. Additionally, strains were grown for 72 h at 0.1, 0.18 or 0.25 mg ml⁻¹ to determine MICs of MBOA,

the MIC was recorded as the concentration where the OD_{600} did not increase more than 10% over the 0.05 initial value. At least two independent experiments with five replicates were performed for each variable evaluated. Clump disaggregation of auto-agglutinated cells was determined by microscopic examinations using a Nikon Diaphot phase contrast inverted microscope.

Plant experiments

Nodulation and nitrogen fixation were evaluated with common bean plants (*P. vulgaris* cv. Negro Xamapa) 4 weeks after inoculation as previously described (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Experiments with maize were performed with the cultivar Criollo de Amatlán. The sterilization and germination of maize seeds were performed as previously described (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004). After germination, two seedlings were transferred to 1 L of pots filled with sterile vermiculite and watered with 150 ml of Fahraeus solution (Fahraeus, 1957), and incubated overnight in the dark at 30°C. Bacteria were grown to late exponential phase ($OD_{600} = 0.8$), harvested by centrifugation and re-suspended in 10 mM MgSO₄·7H₂O. Appropriate volumes of these suspensions were mixed with 150 ml of Fahraeus solution and this volume was homogeneously distributed in each pot. A total of 10^8 or 0.5×10^8 cfu were used for single or double strain inoculations, respectively. Plants were grown in a greenhouse under natural illumination. Two weeks after inoculation, rhizospheric and endophytic bacteria were obtained as previously described (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2004). Briefly, roots were manually cleaned of gross vermiculite particles and sonicated in an ice bath for 5 min using a Branson 1510 (Branson) ultrasonic cleaner to liberate bacteria from the vermiculite and root surface, and the resulting suspension was considered to contain bacteria from the rhizosphere (but also contained bacteria from the rhizoplane). Sonicated roots were washed with water, sterilized by immersion in 1.2% sodium hypochlorite for 3 min with agitation, rinsed in 2% sodium thiosulfate to eliminate chlorine, and thoroughly rinsed with water. Surface sterility was checked by rolling the roots over PY agar plates and incubating the plates for 5 days. The roots were mixed with nine times their weight of water, cut into small pieces and ground with a mortar and pestle for 3 min to release endophytic bacteria. The rhizosphere and endosphere suspensions were serially diluted with 10 mM MgSO₄·7H₂O and plated on PY, and PY with the proper antibiotics. Colonies growing in PY containing kanamycin were checked for GFP fluorescence under UV to confirm that were the inoculated mutants. Colonization was expressed as cfu g⁻¹ of fresh weight. The experimental unit consisted of one pot with two plants. The experiments were independently performed two times with five replicate pots per treatment. For statistical analyses, data were logarithmically transformed and subjected to an analysis of variance. Means were compared by the Duncan's multiple-range test.

Acknowledgements

E. Ormeño-Orrillo acknowledges a scholarship from DGEP-UNAM for graduate studies in the Biomedical Sciences Doc-

toral Program of UNAM. We are grateful to J. Michiels and M. Moris for their advice during the mutant library construction, to A. García-de los Santos for providing plasmid pAGS10, to P. Vinuesa for providing a cosmid used to obtain some sequences and for useful suggestions, and to M.A. Rogel, I. Toledo, J. Martínez-Romero and J. Quiroz for technical assistance. We thank Michael Dunn for reading the manuscript. Financial support was from DGAPA through PAPIIT grant IN201106-3. The authors acknowledge three anonymous reviewers for their valuable recommendations and comments to improve the manuscript.

References

- Abeyrathne, P.D., Daniels, C., Poon, K.K., Mawish, M.J., and Lam, J.S. (2005) Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **187**: 3002–3012.
- Acosta-Duran, C., and Martínez-Romero, E. (2002) Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch Microbiol* **178**: 161–164.
- Andrade, D.S., Murphy, P.J., and Giller, K.E. (2002) The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4025–4034.
- Araujo, R.S., Robledo, E.A., and Handelsman, J. (1994) A hydrophobic mutant of *Rhizobium etli* altered in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1430–1436.
- Azpilicueta, C.E., Zawoznik, M.S., and Tomaro, M.L. (2004) Phytoalexins synthesis is enhanced in groundnut plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*). *Crop Prot* **23**: 1069–1074.
- Becker, A., Frayse, N., and Sharypova, L. (2005) Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 899–905.
- Bemal, G.R., Tlustý, B., Estevez de Jensen, C., van Berkum, P., and Graham, P.H. (2004) Characteristics of rhizobia nodulating beans in the central region of Minnesota. *Can J Microbiol* **50**: 1023–1031.
- Besemer, J., and Borodovsky, M. (1999) Heuristic approach to deriving models for gene finding. *Nucleic Acids Res* **27**: 3911–3920.
- Campbell, G.R., Sharypova, L.A., Scheidle, H., Jones, K.M., Niehaus, K., Becker, A., and Walker, G.C. (2003) Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J Bacteriol* **185**: 3853–3862.
- Canals, R., Jimenez, N., Vilches, S., Regue, M., Merino, S., and Tomas, J.M. (2006) The UDP *N*-acetylgalactosamine 4-epimerase gene is essential for mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotype O34 virulence. *Infect Immun* **74**: 537–548.
- Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sanchez-Contreras, M., Rivilla, R., and Martín, M. (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889–3897.
- Carlson, R.W. (1984) Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *J Bacteriol* **158**: 1012–1017.
- Carlson, R.W., Sanders, R.E., Napoli, C., and Albersheim, P. (1978) Host-symbiont interactions. III. Purification and partial characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *Plant Physiol* **62**: 912–917.
- Castro, M.S., and Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett* **12**: 13–18.
- Chabot, R., Antoun, H., and Cescas, M. (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant Soil* **184**: 311–321.
- Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Ba, A., Gillis, M., et al. (2000) Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5437–5447.
- Chiapusio, G., Pellissier, F., and Gallet, C. (2004) Uptake and translocation of phytochemical 2-benzoxazolinone (BOA) in radish seeds and seedlings. *J Exp Bot* **55**: 1587–1592.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E.A. (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4951–4959.
- Corcuera, L.J., Woodward, M.D., Helgeson, J.P., Kelman, A., and Upper, C.D. (1978) 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species. *Plant Physiol* **61**: 791–795.
- Corzo, J., Perez-Galdona, R., Leon-Barrios, M., and Gutierrez-Navarro, A.M. (1991) Alcian blue fixation allows silver staining of the isolated polysaccharide component of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **12**: 439–441.
- Creuzenet, C., and Lam, J.S. (2001) Topological and functional characterization of WbpM, an inner membrane UDP-GlcNAc C6 dehydratase essential for lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **41**: 1295–1310.
- Cuthbertson, L., Powers, J., and Whitfield, C. (2005) The C-terminal domain of the nucleotide-binding domain protein Wzt determines substrate specificity in the ATP-binding cassette transporter for the lipopolysaccharide O-antigens in *Escherichia coli* serotypes O8 and O9a. *J Biol Chem* **280**: 30310–30319.
- D'Haese, W., and Holsters, M. (2004) Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends Microbiol* **12**: 555–561.
- D'Haese, W., Glushka, J., De Rycke, R., Holsters, M., and Carlson, R.W. (2004) Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol Microbiol* **52**: 485–500.
- De Castro, C., Molinaro, A., Lanzetta, R., Holst, O., and Parrilli, M. (2005) The linkage between O-specific caryan and core region in the lipopolysaccharide of *Burkholderia caryophylli* is furnished by a primer monosaccharide. *Carbohydr Res* **340**: 1802–1807.
- Dekkers, L.C., van der Bij, A.J., Mulders, I.H., Phoelich, C.C., Wentwood, R.A., Glandorf, D.C., et al. (1998) Role of the

- O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH: ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 763–771.
- Dorr, J., Hurek, T., and Reinhold-Hurek, B. (1998) Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol Microbiol* **30**: 7–17.
- Doty, S.L., Doshier, M.R., Singleton, G.L., Moore, A.L., Van Aken, B., Stettler, R.F., et al. (2005) Identification of an endophytic *Rhizobium* in stems of *Populus*. *Symbiosis* **39**: 27–35.
- Duijff, B.J., Gianinazzi-Pearson, V., and Lemanceau, P. (1997) Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol* **135**: 325–334.
- Duvick, J.P., Rood, T., Rao, A.G., and Marshak, D.R. (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Biol Chem* **267**: 18814–18820.
- Eisenschenk, L., Diebold, R., Perez-Lesher, J., Peterson, A.C., Kent Peters, N., and Noel, K.D. (1994) Inhibition of *Rhizobium etli* polysaccharide mutants by *Phaseolus vulgaris* root compounds. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3315–3322.
- Fahraeus, G. (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* **16**: 374–381.
- Falconi, T., Manti, A., Boi, P., Canonico, B., Balsamo, M., and Papa, S. (2006) Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* **70**: 149–153.
- García-de los Santos, A., and Brom, S. (1997) Characterization of two plasmid-borne *lpsB* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 891–902.
- Gil-Serrano, A.M., Gonzalez-Jimenez, I., Tejero Mateo, P., Bernabe, M., Jimenez-Barbero, J., Megias, M., and Romero-Vazquez, M.J. (1995) Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Carbohydr Res* **275**: 285–294.
- Gil-Serrano, A., Sanchez del Junco, A., Tejero-Mateo, P., Megias, M., and Caviedes, M.A. (1990) Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. phaseoli CIAT 899. *Carbohydr Res* **204**: 103–107.
- Gonzalez-Pasayo, R., and Martínez-Romero, E. (2000) Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 572–577.
- Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martínez, E., et al. (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can J Microbiol* **40**: 189–207.
- Gutiérrez-Zamora, M.L., and Martínez-Romero, E. (2001) Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol* **91**: 117–126.
- 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.
- Hitchcock, P.J., and Brown, T.M. (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* **154**: 269–277.
- Hungria, M., Andrade, D.D.S., Chueire, L.M.D.O., Probanza, A., Gutierrez-Mañero, F.J., and Megias, M. (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem* **32**: 1515–1528.
- Iniguez, A.L., Dong, Y., Carter, H.D., Ahmer, B.M., Stone, J.M., and Triplett, E.W. (2005) Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 169–178.
- Jensen, S.O., and Reeves, P.R. (1998) Domain organisation in phosphomannose isomerases (types I and II). *Biochim Biophys Acta* **1382**: 5–7.
- Jofre, E., Lagares, A., and Mori, G. (2004) Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* **231**: 267–275.
- Kannenberg, E.L., Reuhs, B.L., Forsberg, L.S., and Carlson, R.W. (1998) Lipopolysaccharides and K antigens: their structures, biosynthesis and functions. In *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink, H., Kondorosi, A., and Hooykaas, P. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 119–154.
- Kingsley, M.T., and Bohlool, B.B. (1992) Extracellular polysaccharide is not responsible for aluminum tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CIAT899. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1095–1101.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175–176.
- Krafczyk, I., Trollenier, G., and Beringer, H. (1984) Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol Biochem* **16**: 315–322.
- Latour, X., Delome, S., Mirleau, P., and Lemanceau, P. (2004) Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* **23**: 397–405.
- Lerouge, I., and Vanderleyden, J. (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 17–47.
- Lerouge, I., Laeremans, T., Verreth, C., Vanderleyden, J., Van Soom, C., Tobin, A., and Carlson, R.W. (2001) Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an *lps* mutant deficient in O-antigen. *J Biol Chem* **276**: 17190–17198.
- Lohrke, S.M., Dery, P.D., Li, W., Reedy, R., Kobayashi, D.Y., and Roberts, D.R. (2002) Mutation of *ripA* in *Enterobacter*

- cloacae* decreases seed and root colonization and bio-control of damping-off caused by *Pythium ultimum* on cucumber. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 817–825.
- Lugtenberg, B.J., Dekkers, L., and Bloembergen, G.V. (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* 39: 461–490.
- Lupwayi, N.Z., Clayton, G.W., Hanson, K.G., Rice, W.A., and Biederbeck, V.O. (2004) Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. *Can J Plant Sci* 84: 37–45.
- de Maagd, R.A., Rao, A.S., Mulders, I.H., Goosen-de Roo, L., van Loosdrecht, M.C., Wiffelman, C.A., and Lugtenberg, B.J. (1989) Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J Bacteriol* 171: 1143–1150.
- Makarova, K.S., Aravind, L., and Koonin, E.V. (1999) A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Sci* 8: 1714–1719.
- Maki, M., and Renkonen, R. (2004) Biosynthesis of 6-deoxyhexose glycans in bacteria. *Glycobiology* 14: 1R–15R.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., and Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* 41: 417–426.
- Miche, L., Battistoni, F., Gemmer, S., Belghazi, M., and Reinhold-Hurek, B. (2006) Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 502–511.
- Milner, J.L., Araujo, R.S., and Handelsman, J. (1992) Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. *Mol Microbiol* 6: 3137–3147.
- Newman, M.A., Dow, J.M., and Daniels, M.J. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and plant–pathogen interactions. *Eur J Plant Pathol* 107: 95–102.
- Niehaus, K., Lagares, A., and Puehler, A. (1998) A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 906–914.
- Niemeyer, H.M. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27: 3349–3358.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 593–656.
- Noel, K.D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J., and Cevallos, M.A. (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol* 158: 148–155.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalik, H., Olivares, J., Lluch, C., and Sanjuan, J. (2002) *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 225–232.
- O'Sullivan, L.A., Weightman, A.J., Jones, T.H., Marchbank, A.M., Tiedje, J.M., and Mahenthiralingam, E. (2007) Identifying the genetic basis of ecologically and biotechnologically useful functions of the bacterium *Burkholderia vietnamiensis*. *Environ Microbiol* 9: 1017–1034.
- Perotto, S., Brewin, N.J., and Kannenberg, E.L. (1994) Cytological evidence for a host defence response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharides-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 99–112.
- Priefer, U.B. (1989) Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae VF39. *J Bacteriol* 171: 6161–6168.
- Raetz, C.R., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635–700.
- Ramos-Aires, J., Plesiat, P., Kocjancic-Curty, L., and Kohler, T. (2004) Selection of an antibiotic-hypersusceptible mutant of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the GlmR transcriptional regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 843–851.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., and Hurek, T. (2006) An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 181–188.
- Riccillo, P.M., Collavino, M.M., Grasso, D.H., England, R., de Bruijn, F.J., and Aguilar, O.M. (2000) A *guaB* mutant strain of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1228–1236.
- Roberts, D.P., McKenna, L.F., Hu, X., Lohrke, S.M., Kong, H.S., de Souza, J.T., et al. (2006) Mutation in *cyaA* in *Enterobacter cloacae* decreases cucumber root colonization. *Arch Microbiol* 187: 101–115.
- Rosconi, F., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Platero, R.A., Gonzalez, C., Gonzalez, M., et al. (2006) Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol Lett* 258: 214–219.
- Rosenblueth, M., and Martínez-Romero, E. (2004) *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch Microbiol* 181: 337–344.
- Rosenblueth, M., and Martínez-Romero, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 827–837.
- Sabry, S.R.S., Saleh, S.A., Batchelor, C.A., Jones, J., Jotham, J., Webster, G., et al. (1997) Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc R Soc Lond* 264: 341–346.
- Scheidle, H., Gross, A., and Niehaus, K. (2005) The lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol* 165: 559–566.
- Simons, M., van der Bij, A.J., Brand, I., de Weger, L.A., Wiffelman, C.A., and Lugtenberg, B.J. (1996) Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 600–607.
- Stacey, G., So, J.S., Roth, L.E., Lakshmi, S.B., and Carlson,

- R.W. (1991) A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 332–340.
- Stone, P., O'Callaghan, K.J., Davey, M.R., and Cocking, E.C. (2001) *Azorhizobium caulinodans* ORS571 colonizes the xylem of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 93–97.
- Tellstroem, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Kuester, H., and Niehaus, K. (2007) The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **143**: 825–837.
- Valverde, C., Hozbor, D.F., and Lagares, A. (1997) Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques* **22**: 230–232,234,236.
- Vincent, J.M. (1970) *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford, UK: Blackwell Scientific.
- Vinuesa, P., Reuhs, B.L., Breton, C., and Werner, D. (1999) Identification of a plasmid-borne locus in *Rhizobium etli* KIM5s involved in lipopolysaccharide O-chain biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol* **181**: 5606–5614.
- Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H.P., Martínez-Romero, E., and Werner, D. (2003) Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 159–168.
- de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., et al. (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 1173–1180.
- Xi, C., Lambrecht, M., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (1999) Bi-functional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *J Microbiol Methods* **35**: 85–92.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., et al. (1997) Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* **194**: 99–114.
- Young, J.P., Crossman, L.C., Johnston, A.W., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., et al. (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**: R34.
- Zhang, J., Boone, L., Kocz, R., Zhang, C., Binns, A.N., and Lynn, D.G. (2000) At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation. *Chem Biol* **7**: 611–621.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. Auto-agglutination phenotypes of the *R. tropici* LPS mutants.

Fig. S2. Gum production (A) and Calcofluor fluorescence (B) shown by the *R. tropici* parental strain and LPS mutants in PY, YEM and MM media.

Table S1. Effect of the sonication treatment on viability.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

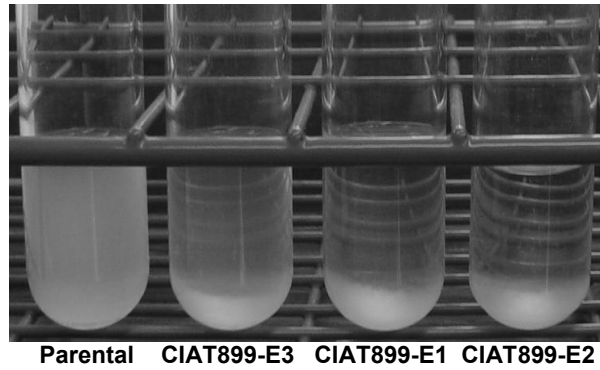


Fig. S1. Autoagglutination phenotypes of the *R. tropici* LPS mutants.

The strains were grown in PY medium under agitation to an $OD_{600} = 1$ and left unshaken for 24h.

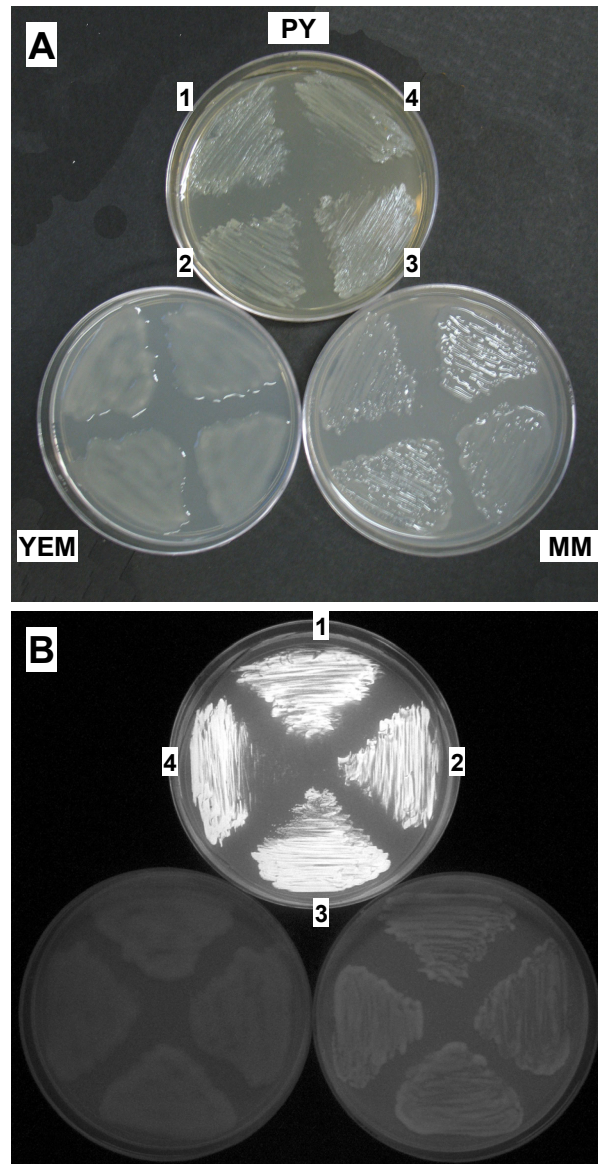


Fig. S2. Gum production (A) and Calcofluor fluorescence (B) shown by the *R. tropici* parental strain and LPS mutants in PY, YEM and MM media.

The numbers indicated for the PY plate correspond to: 1, Parental; 2, CIAT899-E1; 3, CIAT899-E2; 4, CIAT899-E3. The strains are in the same positions in YEM and MM.

Table S1. Effect of the sonication treatment on viability.

Strain	Viable counts (Log_{10} UFC ml^{-1}) ^a		Difference
	Before sonication	After sonication	
CIAT899	5.12 ± 0.05	5.19 ± 0.04	ns ^b
CIAT899-E1	5.04 ± 0.04	5.03 ± 0.09	ns
CIAT899-E2	5.18 ± 0.02	5.13 ± 0.03	ns
CIAT899-E3	5.27 ± 0.05	5.28 ± 0.05	ns

a. Mid log cultures were suspended in sterile water to 10^5 UFC ml^{-1} and sonicated in an ice bath for 15 min using a Bransonic 1510 (Branson) ultrasonic cleaner. Plate counts were determined before and after the sonication treatment.

b. ns, no significant difference in the viable counts before and after sonication at $P = 0.01$ according to paired t tests.

RESULTADOS ADICIONALES

Análisis de un grupo de genes para biosíntesis de LPS de *R. tropici* CIAT899

Durante el estudio del loci afectado en la mutante CIAT899-E1 secuenciamos las regiones ubicadas inmediatamente corriente arriba del gen *wzm* y corriente abajo del gen *wzt*. Al analizar estas secuencias descubrimos que codificaban para ORFs cuyas funciones probables se relacionaban con biosíntesis de LPS. Muchas veces los genes que codifican para transportadores de antígeno O se encuentran agrupados con otros que también intervienen en la biosíntesis de este dominio del LPS (Samuel y Reeves, 2003). Por este motivo, decidimos seguir secuenciando el cósmido pCOS-E1 que complementó a la mutante CIAT899-E1 con la perspectiva de encontrar nuevos genes involucrados en la biosíntesis del antígeno O de *R. tropici* CIAT899. Para este fin diseñamos oligonucleótidos cebadores a partir de las secuencias que se iban obteniendo y así fuimos avanzando en la secuenciación (estrategia conocida en inglés como “primer-walking”). El programa GeneMark (Besemer y Borodovsky, 2005) se utilizó para predecir ORFs en la región secuenciada. BLASTX y BLASTP fueron utilizados para buscar secuencias similares en las bases de datos. Se identificaron dominios conservados mediante el servidor web InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). El programa ClustalW v1.8 fue utilizado para alinear secuencias (Thompson et al., 1994). La localización subcelular se predijo mediante el programa PSORTb v.2.0.4 (Gardy et al., 2005) y los segmentos transmembranales se predijeron mediante el servidor web TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk:80/services/TMHMM/>). Se asignaron funciones probables a los ORFs en base a la similitud con proteínas de las bases de datos y a la presencia de dominios conservados.

Se determinó la secuencia de un fragmento de 10,334 nucleótidos centrados en el gen *wzt*. Se identificaron 10 ORFs con funciones probables relacionadas con biosíntesis de polisacáridos de superficie, y dos remanentes de genes (Figura 1). Los elementos identificados se agruparon de acuerdo a su función y se describen a continuación.

Productos probables:

orf1, acetiltransferasa (secuencia parcial)

orf2, metiltransferasa

orf3, epimerasa/deshidratasa de nucleotido azucar

orf4, glucosiltransferasa

wzm, componente transmembranal de transportador ABC de antígeno O

wzt, componente ATPasa de transportador ABC de antígeno O

orf5, glucosiltransferasa

orf6, glucosiltransferasa

IS*, remanente de secuencia de inserción

*traG**, remanente de *traG*

orfL, ligasa de antígeno O

orf7, transferasa inicial para biosíntesis de antígeno O

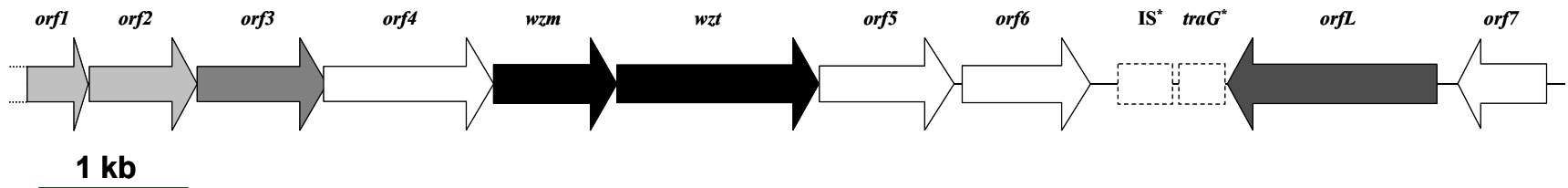


Fig. 1. Organización genética y probables funciones del grupo de genes para biosíntesis de LPS identificado en *R. tropici* CIAT899.

Gen para la biosíntesis de un nucleótido-azúcar

La secuencia de aminoácidos deducida del *orf3* mostró similitudes con varios genes anotados como probables epimerasas o reductasas de nucleótido-azúcar (Tabla 1). Los nucleótido-azúcares actúan como donadores de los monosacáridos necesarios para la biosíntesis de polisacáridos. Para la síntesis de la unidad repetida del antígeno O de *R. tropici* CIAT899 se requieren los nucleótido-azúcares GDP-L-fucosa y GDP-6d-D-talosa (Gil-Serrano et al., 1995). El ORF3 no presentó similitudes significativas con las enzimas Gmer/Fcl y Gts/Tld requeridas para la síntesis de GDP-L-fucosa y GDP-6d-D-talosa, respectivamente (datos no mostrados), por lo que este ORF debe participar en la producción de otro azúcar activado requerido para la producción del antígeno O de *R. tropici* CIAT899.

Genes para glucosiltransferasas

Tres de los ORFs identificados (*orf5*, *orf6* y *orf7*) codificaron para proteínas similares a probables glucosiltransferasas (GTs) (Tabla 1), sin embargo el bajo nivel de similitud con GTs caracterizadas experimentalmente no permitió asignar actividades específicas. Basándose en la información parcial que se tiene sobre la estructura del antígeno O de *R. tropici* CIAT899 (ver Tabla 2 en la p. 15) (Gil-Serrano et al., 1995), se puede predecir que se requieren al menos tres GTs para su biosíntesis, dos que retengan la configuración anomérica del azúcar del donador y una GT inversora. En base a la presencia de dominios conservados, los ORF5 y ORF6 pueden ser asignados a la familia de transferasas GT2 ($E = 4e^{-20}$ y $5e^{-28}$), y el ORF4 a la familia GT1 ($E = 1.4e^{-19}$). Los miembros de ambas familias actúan por un mecanismo inversor (Coutinho et al., 2003). En consecuencia podemos predecir que faltan por descubrir al menos dos GTs que retengan la configuración anomérica, y que dos de los residuos de otros subdominios no caracterizados del antígeno O tendrán una configuración α .

Tabla 1. Similitud de los ORFs de *R. tropici* CIAT899 con proteínas de las bases de datos según el programa BLASTP

ORF (aa)	Proteína similar ^a / Organismo	Tamaño (aa)	Producto	I/S ^b (%)	E	Número de acceso
ORF1 (100)	RHE_CH00751 / <i>Rhizobium etli</i> CFN 42	214	probable O-acetiltransferase	48/63	4e-23	ABC89565
	WcrU / <i>Streptococcus pneumoniae</i> Rose	204	probable acetiltransferasa	60/73	2e-13	CAI33514
	Vat / <i>Staphylococcus aureus</i>	219	acetiltransferasa	58/74	3e-9	AAA26683
ORF2 (241)	RHE_CH00752 / <i>R. etli</i> CFN42	286	probable metiltransferasea dependiente de SAM	36/51	7e-30	ABC89566
	CpcM / <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	399	metiltransferasa de ficobilina	33/42	3e-3	AAC14722
	UbiG / <i>Escherichia coli</i> K-12	240	3-demetilubiquinona-9 3-metiltransferasa	28/43	3e-2	AAA24714
ORF3 (290)	RHE_CH00760 / <i>R. etli</i> CFN42	302	probable epimerasa de nucleótido azúcar	30/50	3e-39	ABC89574
	LipDig2 / <i>Streptomyces aureofaciens</i> Tu117	322	probable 4,6-deshidratasa	28/44	2e-24	ABB05098
	ORF2 / <i>R. etli</i> KIM5s	272	probable dTDP-glucosa 4,6-deshidratasa	33/47	1e-23	AAD47914
ORF4 (380)	RHE_CH00757 / <i>R. etli</i> CFN42	394	probable glucosiltransferasa	33/52	4e-48	ABC89571
	RHE_CH00756 / <i>R. etli</i> CFN42	389	probable α -glucosiltransferasa	32/48	5e-43	ABC89570
	ORF3 / <i>R. etli</i> KIM5S	235	probable α -glucosiltransferasa	37/56	6e-27	AAD47915
	WbdP / <i>Citrobacter freundii</i> M1972	404	probable glucosiltransferasa	29/49	1e-20	AAV34498
Wzm (276)	Wzm / <i>Burkholderia pseudomallei</i> ATCC23344	277	probable componente membranal de transportador ABC-2	35/58	4e-38	AAK27395
	Wzm / <i>Serratia marcescens</i> N28b	277	probable componente membranal de transportador ABC-2	38/59	4e-38	AAC00181
	Wzm / <i>Klebsiella pneumoniae</i>		probable componente membranal de transportador ABC-2	37/59	4e-37	AAN06492
Wzt (452)	Wzt / <i>Geobacillus stearothermophilus</i> NRS2004/3a	409	ATPasa de probable transportador ABC	53/71	2e-69	AAR99607
	Wzt / <i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257	442	probable ATPasa de transportador ABC	37/53	3e-67	AAQ82930
	Wzt / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	440	transportador ABC-2, proteína ATPasa	51/65	2e-66	AAN06493
ORF5 (301)	RHE_CH00761 / <i>R. etli</i> CFN42	286	probable β -glucosiltransferasa	45/60	4e-62	ABC89575
	ORF4 / <i>R. etli</i> KIM5S	276	probable β -glucosiltransferasa	32/51	1e-18	AAD47916
	WbyL / <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> pa3606	247	proteína parecida a glucosiltransferasa	29/51	2e-15	CAB63303
ORF6 (287)	WbdL / <i>Salmonella enterica</i> Adelaide	297	probable β -glucosiltransferasa	34/54	4e-20	AAK83018
	ORF4 / <i>R. etli</i> KIM5S	276	probable β -glucosiltransferasa	32/47	1e-19	AAD47916
	WbdL / <i>E. coli</i> Stole W	297	probable glucosiltransferasa	32/55	3e-18	AAD46731

Tabla 1. Continuación.

ORF (aa)	Proteína similar ^a / Organismo	Tamaño (aa)	Producto	I/S ^b (%)	E	Número de acceso
ORFL (469)	Waa* / <i>Brucella abortus</i> 2308	703	glucosiltransferasa	33/51	4e-51	CAD20562
	WaaL / <i>Vibrio cholerae</i> V194	403	ligasa de antígeno O	33/48	4e-2	AAL77359
ORF7 (197)	Lpsβ1 / <i>R. etli</i> CFN42	188	probable galactosil transferasa	72/84	1e-72	ABC93045
	WbqP / <i>Caulobacter crescentus</i> CB15	186	probable galactosil transferasa	63/76	4e-58	DAA00349
	CpsF / <i>Streptococcus iniae</i>	200	probable glucosiltransferasa	53/70	1e-48	AAV17298
	Cap1N / <i>Staphylococcus aureus</i> M	185	proteína para síntesis de capsula tipo 8	49/70	1e-44	AAL26667

^a Se muestran solo las 3 o 4 proteínas más similares que han sido caracterizada experimentalmente o que forman parte de grupos de genes asignados a alguna función conocida.

^b (I)dentidad y (S)imilitud entre las secuencias de aminoácidos.

El producto del *orf7* fue similar a CpsF/Cps9F y a Cap1N de *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Table 1). Estas enzimas realizan la reacción inicial durante la síntesis de polisacáridos capsulares (CPS). Esta reacción ocurre en el lado citoplasmático de la membrana interna y consiste en la transferencia de un azúcar fosfato desde un donador nucleótido-azúcar hacia un acarreador lipídico de tipo poliisoprenoide (Bentley et al., 2006). Posteriormente, la cadena de polisacárido va siendo ensamblada sobre este residuo glucosídico inicial. CpsF, Cps9F, Cap1N y el ORF7 contienen el dominio conservado WcaJ que esta presente en una familia de proteínas cuyos miembros llevan a cabo las reacciones iniciales durante la biosíntesis de CPS, exopolisacáridos y del antígeno O del LPS (Raetz y Whitfield, 2002; Valvano, 2003). Se predice que el ORF7 es una proteína de membrana interna (PSORTb score = 9.82) con un segmento transmembranal cerca al extremo amino (aminoácidos 15-35) lo que concuerda con las características de las proteínas de la familia WcaJ (Valvano, 2003). En vista de esto, proponemos que el ORF7 podría actuar como la transferasa inicial durante la biosíntesis del antígeno O de *R. tropici* CIAT899. Previamente hemos sugerido que la acetilquinosamina sintetizada por Lps β 2 podría ser este residuo inicial (Ormeño-Orrillo et al., 2008). La secuencia del ORF7 presenta una alta identidad con Lps β 1 de *R. etli* CFN42 (Tabla 1) lo que podría sugerir que ambas cepas comparten la reacción inicial durante la biosíntesis de antígeno O.

Genes para otras clases de transferasas

Dos de los ORFs identificados pueden estar involucrados en añadir grupos alifáticos al LPS de *R. tropici* CIAT899. El producto del *orf2* presenta el dominio conservado Methyltransf_11 (PF08241) ($E = 6e^{-18}$), y mostró similitud baja con varias probables metiltransferasas (Tabla 1). Entre esas metiltransferasas, la proteína RHE_CH00752 de *R. etli* CFN42 es necesaria para la biosíntesis del antígeno O (Lerouge et al., 2003). No se han descrito metilaciones en la unidad repetida del antígeno O de *R. tropici* CIAT899 pero estas decoraciones podrían estar presentes en algún otro de los probables subdominios no caracterizados del antígeno O.

El primer ORF del grupo fue parcialmente secuenciado pero en él se logró identificar el dominio conservado Hexapep (PF00132) ($E = 8e^{-5}$). Este dominio está presente en una gran diversidad de transferasas de grupos acilo (Raetz y Roderick, 1995). El producto deducido del *orf1* fue similar a probables acetiltransferasas descritas en varios grupos de genes para la biosíntesis de polisacáridos de superficie (Tabla 1), incluyendo RHE_CH00751 de *R. etli* CFN42 que es indispensable para la producción del antígeno O de esta cepa (Lerouge et al., 2003). El producto del *orf1* podría ser el gen responsable de las acetilaciones en los residuos de 6d-D-talosa reportadas para el antígeno O de *R. tropici* CIAT899 (Gil-Serrano et al., 1995).

Genes para el procesamiento del antígeno O

Como hemos mencionado, el locus que estamos describiendo se descubrió en la vecindad del gen *wzt*. Una mutación en este gen causó un fenotipo de LPS sin antígeno O lo que concuerda con su probable función como el componente con actividad ATPasa de un transportador ABC de antígeno O (Ormeño-Orrillo et al., 2008). Corriente arriba de *wzt* encontramos a *wzm*, el probable componente transmembranal del transportador (Tabla 1). Esta clase de genes también se han descrito en *R. etli* CFN42 (Lerouge et al., 2001) por lo que nos preguntamos si podría darse una complementación funcional con el transportador de *R. tropici* CIAT899. Con este fin clonamos los genes *wzm-wzt* de *R. tropici* CIAT899 bajo el control de un promotor constitutivo en el plásmido pFAJ1708. Los genes *wzm-wzt* de *R. etli* CFN42 clonados en el mismo vector y la mutante FAJ1200 (*wzm::mTn5*) fueron proporcionados por Jos Vanderleyden (Lerouge et al., 2001). Introdujimos los plásmidos en las mutantes FAJ1200 y CIAT899-E1 (*wzt::mTn5*) mediante cruces triparentales, y verificamos la complementación mediante la pérdida del fenotipo de autoaglutinación (Ormeño-Orrillo et al., 2008). Los genes de CIAT899 y CFN42 complementaron a las respectivas mutantes, sin embargo no se observó complementación heteróloga. Estos resultados indican que los transportadores son específicos para la estructura del antígeno O.

En la región ubicada corriente abajo del *orf7* se predijo un orf que codifica para una probable proteína hidrofóbica localizada en la membrana interna (PSORTb score = 10). La secuencia de aminoácidos predicha fue similar a un grupo de proteínas de *Brucella* spp. (Tabla 1). El homólogo de *B. abortus* 2308 ha sido anotado como una GT debido a que una mutante en ese gen produjo un oligosacárido núcleo (ON) alterado y a que la secuencia presentó el dominio conservado Glycosyl_transf_25 (Monreal et al., 2003). El gen de *B. abortus* es de 2112 nt y parece corresponder a una fusión entre un gen que codifica para un GT y otro no caracterizado. La región de homología entre el *orf* de *R. tropici* y el de *Brucella* comprende la región no caracterizada del gen de *Brucella*, por lo que no podemos establecer una relación directa entre las funciones de ambos.

La siguiente proteína caracterizada más similar al ORF de *R. tropici* fue la ligasa de antígeno O de *Vibrio cholerae* V194 (Tabla 1) (Schild et al., 2005). Las ligasas de antígeno O, codificadas por genes denominados *waaL*, son proteínas de membrana que realizan el último paso en el procesamiento del antígeno O, su unión al lípido A - ON para completar la molécula de LPS (Whitfield et al., 1997). Estas proteínas presentan baja similitud en sus secuencias pero conservan una topología similar con 8-12 segmentos transmembranales y una asa periplasmática relativamente larga (Heinrichs et al., 1998; Abeyrathne et al., 2005). La secuencia del ORF de *R. tropici* presentó muy baja identidad global con ligasas de antígeno O (rango = 8-11%) pero observamos una gran similitud al comparar su perfil de hidrofobicidad con el de WaaL de *V. cholerae* V194 (Fig. 2) lo que sugiere una topología similar. La topología predicha para el ORF de *R. tropici* fue consistente con la esperada para una ligasa de antígeno O revelando 12 segmentos transmembranales, extremos amino y carboxilo ubicados en el citoplasma y una asa periplasmática de 100 aminoácidos de largo ubicada entre los segmentos transmembranales 9 y 10 (Fig. 3A). Así mismo, se identificaron el dominio conservado PF04932 y el motivo HX₁₀G, ambos relacionados con ligasas de antígeno O (Fig. 3B) (Schild et al., 2005). Nombramos provisionalmente a este orf como *orfL*. Su caracterización está en progreso.

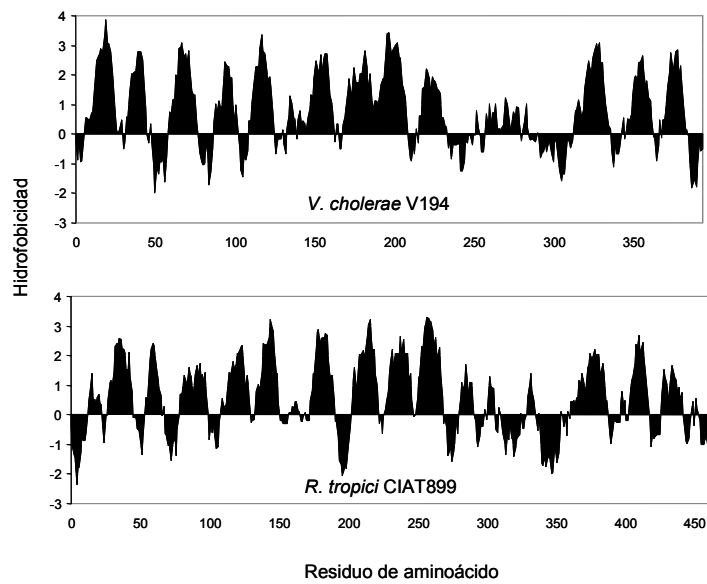


Fig. 2. Comparación ente los perfiles de hidrofobicidad del OrfL de *R. tropici* CIAT899 y WaaL de *V. cholerae* V194

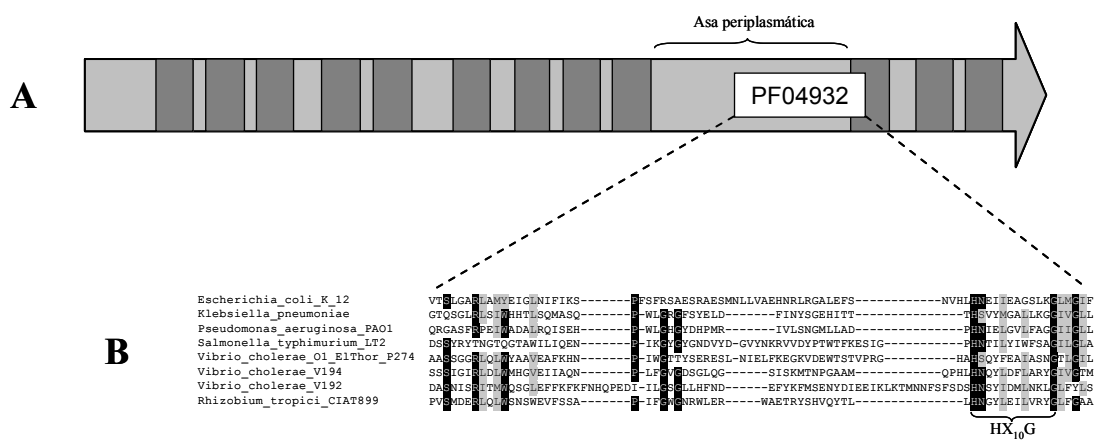


Fig. 3. Representación esquemática del OrfL de *R. tropici* CIAT899 indicando los probables segmentos transmembranales en gris oscuro y la posición del dominio conservado PF04932 (A). Alineamiento del dominio conservado entre el OrfL y varias ligasas de antígeno O señalando el motivo conservado HX₁₀G (B).

Remanentes de genes

Se encontraron remanentes de genes en la región intergénica (IGS) de 913 pb entre el *orf6* y *orfL*. La búsqueda con el programa BLASTX en la base de datos de secuencia de inserción (IS) (<http://www-is.biotoul.fr/>) reveló similitudes con fragmentos de las transposasas de las ISRm10-1 e ISRm10 de *S. meliloti* 2011 y *S. meliloti* BE31CC, respectivamente (Fig 1). Las regiones de homología se encontraron en los tres marcos de lectura lo que indicó la presencia de mutaciones y, por lo tanto, de una transposasa no funcional. Adicionalmente, se identificó una región similar a un fragmento interno de *traG* luego de los remanentes de la transposasa (Fig. 1). La presencia de ISs completas o inactivas, y de remanentes de genes, es común en los grupos de genes para biosíntesis de polisacáridos (Bentley et al., 2006). Se ha especulado que esto refleja la dinámica evolución de estos loci que está en parte mediada por elementos genéticos móviles (Aanensen et al., 2007).

Se ha observado en muchas bacterias que el contenido de G+C de los regiones genéticas para biosíntesis de LPS y de otros polisacáridos es comúnmente menor que el contenido global del genoma. Esta diferencia es interpretada frecuentemente como evidencia de un origen externo a través de fenómenos de transferencia lateral (Raetz y Whitfield, 2002). Fue interesante observar que los contenidos de G+C de los genes de *R. tropici* ubicados corriente arriba del remanente de la transposasa fueron mas bajos que el promedio de 59% en CIAT899, mientras que los genes corriente abajo tuvieron valores más cercanos al promedio.

CONCLUSIONES

Identificamos tres loci involucrados en la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS). Los tres loci son requeridos para la síntesis del antígeno O, y al parecer uno de ellos es necesario además para la síntesis del oligosacárido núcleo. Este es el primer reporte sobre genes para biosíntesis de LPS en *R. tropici* CIAT899.

En uno de los locus identificamos dos ORFs homólogos a los genes *wzm* y *wzt* que codifican para los componentes de un transportador ABC de antígeno O. Este es el segundo reporte en rizobios de este tipo de transportador después del descrito en *R. etli* CFN42 (Lerouge et al., 2001). En enterobacterias se ha reportado otro sistema de transporte para el movimiento del antígeno O de la cara interna a la externa de la membrana citoplasmática que depende de una flipasa codificada por el gen *wzx* (Raetz y Whitfield, 2002). En la secuencia del genoma de *R. leguminosarum* 3841 hemos identificado un homólogo a *wzx* entre un grupo de genes que se presume es necesario para la biosíntesis del antígeno O. Por lo tanto el sistema de transporte dependiente de *wzm-wzt* parece no ser el único presente en el género *Rhizobium*.

Los experimentos de complementación heteróloga que realizamos entre los genes *wzm-wzt* de *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* CFN42 sugieren que los transportadores son específicos para la estructura del antígeno O, y que ambos componentes contribuyen a esta especificidad. La primera observación concuerda con lo reportado para este tipo de transportadores, sin embargo en *E. coli* O8 y O9 se ha demostrado que Wzt es el componente que brinda la especificidad al transporte (Cuthbertson et al., 2005). Más experimentos serán necesarios para comprobar esta diferencia entre los transportadores de *Rhizobium* y *E. coli*.

El análisis del segundo locus de *R. tropici* CIAT899 reveló inesperadamente un homólogo del gen *lpsβ2* de *R. etli* CFN42. El locus *lpsβ*, compuesto por los genes *lpsβ1* y *lpsβ2*, no había sido detectado en *R. tropici* en experimentos de hibridación realizadas

bajo condiciones estrictas (García-de los Santos y Brom, 1997). Sin embargo, aquí observamos que el nivel de identidad entre los genes *lpsβ2* de *R. etli* CFN42 y *R. tropici* CIAT899 es suficientemente alto como para que sus productos puedan realizar la misma función como lo indicó la complementación de una mutación en el gen de *R. tropici* por el homólogo de *R. etli*. Además, determinamos que la mutante de *R. tropici* también fue complementada por el gen *wbpM* de *P. aeruginosa* PAO1, lo que indica que el producto de *lpsβ2* está involucrado en la biosíntesis de UDP-D-acetilquinosamina (Creuzenet y Lam, 2001). Este es la primera evidencia de una posible función específica de *lpsβ2*. Es probable que D-acetilquinosamina sea un monosacárido común en los LPS de *R. etli* y *R. leguminosarum* dado que el locus *lpsβ* ha sido detectado en muchas cepas de esas especies (García-de los Santos y Brom, 1997).

El tercer locus correspondió al gen *noeJ*. Debido a la similitud entre la secuencia del producto de este gen y las enzimas conocidas como fosfomanosa isomerasas de tipo II, y a la complementación funcional de una mutante por el gen *algA* de *P. aeruginosa* concluimos que *noeJ* de *R. tropici* está implicado en la biosíntesis de GDP-D-manosa. El perfil de LPS sugirió que la mutante *noeJ* produce un oligosacárido núcleo incompleto por lo que manosa o algún monosacárido derivado de manosa debe ser un componente del oligosacárido núcleo de *R. tropici* CIAT899. Se ha reportado que manosa es muy común en los oligosacáridos núcleo de rizobios (Kannenberg et al., 1998). Las moléculas de LPS producidas por la mutante *noeJ* tampoco presentaron antígeno O. La mutación en *noeJ* impediría la producción de antígeno O ya que GDP-D-manosa es el precursor para la síntesis de GDP-L-fucosa y GDP-6d-D-talosa que actúan como donadores de la L-fucosa y 6d-D-talosa reportadas como componentes del antígeno O de *R. tropici* CIAT899 (Gil-Serrano et al., 1995; Maki y Renkonen, 2004). Aun cuando esta mutante fuera capaz de sintetizar antígeno O, es probable que el oligosacárido núcleo alterado no pueda actuar como aceptor del antígeno O.

Descubrimos un grupo de genes para biosíntesis de LPS al secuenciar la vecindad del locus *wzm-wzt*. Hemos determinado la secuencia de una región de 10.3 kb pero al parecer el grupo de genes se extiende aun más. Al analizar la secuencia de los productos de estos

genes, encontramos algunos con funciones probables que no habían sido descritas en rizobios como una transferasa inicial para la biosíntesis de antígeno O, y una ligasa de antígeno O.

El gen para la probable transferasa inicial es un homólogo a *lpsβ1* de *R. etli* CFN42 (García-de los Santos y Brom, 1997). Este último gen no ha sido caracterizado experimentalmente mediante mutación pero las evidencias reportadas indican que es necesario para la biosíntesis de LPS. La alta similitud entre Lpsβ1 de CIAT899 y CFN42 sugiere que ambos genes catalizan la misma reacción inicial durante la biosíntesis del antígeno O. Esta reacción podría ser muy general en algunas especies de *Rhizobium* en vista de que el locus *lpsβ* está conservado en varias cepas de *R. etli* y *R. leguminosarum* (García-de los Santos y Brom, 1997; Vinuesa et al., 1999).

En *R. etli* CFN42 los genes *lpsβ1* y *lpsβ2* son contiguos. Esta organización parece estar conservada en varias cepas de *R. etli* y *R. leguminosarum* (García-de los Santos y Brom, 1997). Por el contrario, en *R. tropici* CIAT899 estos genes no son contiguos, y lo mismo ha sido reportado para la cepa KIM5s de *R. etli* (Vinuesa et al., 1999). Aun cuando los genes *lpsβ1* y *lpsβ2* no siempre son contiguos, creemos que si están ligados funcionalmente. Nuestra hipótesis es que Lpsβ2 participa en la biosíntesis de la UDP-D-acetilquinosamina que luego es usada por Lpsβ1 como donador para transferir la D-acetilquinosamina a un acarreador lipídico en el primer paso de la biosíntesis del antígeno O.

Al estudiar los genes para biosíntesis de LPS en *Rhizobium* se revelan diferencias en la organización genética en comparación a los grupos de genes descritos en Enterobacteriaceae. En *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* y géneros relacionados, los genes para biosíntesis de antígeno O casi siempre se encuentran asociados en un grupo único, y lo mismo sucede con los genes para el ensamblaje del oligosacárido núcleo (Raetz y Whitfield, 2002; Samuel y Reeves, 2003). Por el contrario, en *R. etli* CFN42 se han descrito cuatro diferentes loci, α , β , ϵ y *lps166*, involucrados en la síntesis del antígeno O (García-de los Santos y Brom, 1997; Noel y Duelli, 2000). En *R. tropici* observamos una

situación similar, con dos regiones distintas para la biosíntesis del antígeno O, la correspondiente al locus *wzm-wzt* y otra conteniendo el gen *lpsβ2*. En *R. leguminosarum* y *R. etli*, al menos dos regiones, denominadas ϵ y γ , contienen genes para la biosíntesis del ON (Noel y Duelli, 2000). En consecuencia, la organización parece ser más laxa en *Rhizobium*, con varios genes individuales o grupo de genes distribuidos en el genoma. Aun así, existe al menos una región relativamente grande en el genoma de *Rhizobium* que contiene varios genes para la biosíntesis de antígeno O. Esta región corresponde al locus *lpsα* descrito en *R. etli* CFN42, a otra región aún no caracterizada en el cromosoma de *R. leguminosarum* 3841 (Young et al., 2006), y, presumiblemente, al locus que hemos identificado en la vecindad de *wzm-wzt* en *R. tropici* CIAT899.

Las mutantes LPS de *R. tropici* CIAT899 presentaron fenotipos simbióticos similares a los descritos para mutantes equivalentes de *R. etli* CFN42 (Noel y Duelli, 2000). La estructura del antígeno O de *R. tropici* CIAT899 es diferente a la de *R. etli* CFN42, y existe evidencia serológica de que el oligosacárido núcleo también es diferente (Lucas et al., 1996; Ormeño-Orrillo, 2005). En conjunto estos datos indican que, en el caso de la asociación con frijol, el antígeno O y quizás el oligosacárido núcleo cumplen funciones que no dependen de una estructura particular. Estas funciones podrían ser enmascarar otros componentes que afecten negativamente la simbiosis o actuar como barrera protectora frente a las fitoalexinas u otros compuestos antimicrobianos del frijol.

Las mutaciones en los genes de biosíntesis de LPS afectaron negativamente la capacidad de *R. tropici* CIAT899 de colonizar la rizósfera-rizoplano y el interior de la raíz de maíz. Nuestros resultados representan el primer reporte de algún determinante molecular necesario para la interacción de un rizobio con una planta no leguminosa. Si bien ya existían reportes acerca de la influencia negativa de defectos en los LPS sobre la habilidad de colonización rizosférica y endofítica de otras bacterias, en ninguno de dichos estudios se obtuvieron evidencias sobre la función de los LPS en esta clase de interacción. Ello debido probablemente a la complicación de que las mutaciones en genes para biosíntesis de LPS producen efectos pleiotrópicos que pueden afectar negativamente la colonización (Lugtenberg et al., 2001). En nuestro caso, tomamos ventaja de que las

mutantes mostraron diferencias en dichos efectos pleiotrópicos y diferencias en su habilidad de colonización, y así pudimos concluir que los efectos pleiotrópicos no explicaban por completo los fenotipos de colonización. Sin embargo, los fenotipos de colonización fueron congruentes cuando consideramos además un rol directo de los LPS como barrera protectora frente a compuestos antimicrobianos lipofílicos producidos por el maíz.

Es importante resaltar que, aun cuando presentaron menor competitividad y colonización que la silvestre, las mutantes con defectos en los LPS fueron capaces de colonizar la rizósfera-rizoplano y el interior de la raíz en números altos. Resulta evidente que una colonización exitosa de la rizósfera y de la raíz depende del efecto aditivo de muchos factores de la bacteria (Latour et al., 2004), siendo los LPS sólo uno más de ellos.

PERSPECTIVAS

Realizar un análisis funcional del gen que codifica para la probable ligasa de antígeno O identificado en *R. tropici* CIAT899 mediante la evaluación del efecto de una mutación dirigida sobre la síntesis de moléculas de LPS con antígeno O.

Completar la secuencia del grupo de genes para biosíntesis de LPS identificado en *R. tropici* CIAT899 para compararlo con regiones presumiblemente similares identificadas en *R. etli* CFN42, *R. leguminosarum* 3841 y otras bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

- Aanensen, D.M., Mavroidi, A., Bentley, S.D., Reeves, P.R., y Spratt, B.G. (2007) Predicted functions and linkage specificities of the products of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J Bacteriol* **189**: 7856-7876.
- Abeyrathne, P.D., Daniels, C., Poon, K.K., Matewish, M.J., y Lam, J.S. (2005) Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **187**: 3002-3012.
- Anderson, N., Ascher, P., y Haghghi, K. (2002) Root peroxidases and *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* nodulation affinities of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray congruity backcross populations. *Euphytica* **126**: 379-390.
- Becker, A., Fraysse, N., y Sharypova, L. (2005) Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 899-905.
- Bentley, S.D., Aanensen, D.M., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M. et al. (2006) Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**: e31.
- Besemer, J., y Borodovsky, M. (2005) GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res* **33**: W451-454.
- Campbell, G.R., Reuhs, B.L., y Walker, G.C. (2002) Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3938-3943.
- Campbell, G.R., Sharypova, L.A., Scheidle, H., Jones, K.M., Niehaus, K., Becker, A., y Walker, G.C. (2003) Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J Bacteriol* **185**: 3853-3862.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., y Henrissat, B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* **328**: 307-317.
- Creuzenet, C., y Lam, J.S. (2001) Topological and functional characterization of WbpM, an inner membrane UDP-GlcNAc C6 dehydratase essential for lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **41**: 1295-1310.
- Cuthbertson, L., Powers, J., y Whitfield, C. (2005) The C-terminal domain of the nucleotide-binding domain protein Wzt determines substrate specificity in the ATP-binding cassette transporter for the lipopolysaccharide O-antigens in *Escherichia coli* serotypes O8 and O9a. *J Biol Chem* **280**: 30310-30319.
- Dekkers, L.C., van der Bij, A.J., Mulders, I.H., Phoelich, C.C., Wentwoord, R.A., Glandorf, D.C. et al. (1998) Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 763-771.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 7347-7351.
- Dombrecht, B., Vanderleyden, J., y Michiels, J. (2001) Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in Gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 426-430.
- Fraysse, N., Couderc, F., y Poinso, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**: 1365-1380.
- García-de los Santos, A., y Brom, S. (1997) Characterization of two plasmid-borne *lpsB* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 891-902.
- Gardy, J.L., Laird, M.R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C.J., Ester, M., y Brinkman, F.S. (2005) PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* **21**: 617-623.
- Gil-Serrano, A.M., Gonzalez-Jimenez, I., Tejero Mateo, P., Bernabe, M., Jimenez-Barbero, J., Megias, M., y Romero-Vazquez, M.J. (1995) Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Carbohydr Res* **275**: 285-294.

- Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martinez, E. et al. (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian J Microbiol* **40**: 198-207.
- Heinrichs, D.E., Monteiro, M.A., Perry, M.B., y Whitfield, C. (1998) The assembly system for the lipopolysaccharide R2 core-type of *Escherichia coli* is a hybrid of those found in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enterica*. Structure and function of the R2 WaaK and WaaL homologs. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 8849-8859.
- Kannenberg, E.L., Reuhs, B.L., Forsberg, L.S., y Carlson, R.W. (1998) Lipopolysaccharide and K-Antigens: their structures, biosynthesis, and functions. En: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-associated Bacteria*. H. P. Spaink, A.K., P. J. J. Hooykaas (ed). Dordrecht: Kluwer, pp. 119-154.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, y Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Latour, X., Delorme, S., Mirleau, P., y Lemanceau, P. (2004) Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* **23**: 397-405.
- Lerouge, I., y Vanderleyden, J. (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 17-47.
- Lerouge, I., Laeremans, T., Verreth, C., Vanderleyden, J., Van Soom, C., Tobin, A., y Carlson, R.W. (2001) Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an *lps* mutant deficient in O-antigen. *J Biol Chem* **276**: 17190-17198.
- Lerouge, I., Verreth, C., Michiels, J., Carlson, R.W., Datta, A., Gao, M.Y., y Vanderleyden, J. (2003) Three genes encoding for putative methyl- and acetyltransferases map adjacent to the *wzm* and *wzt* genes and are essential for O-antigen biosynthesis in *Rhizobium etli* CE3. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1085-1093.
- Lucas, M.M., Peart, J.L., Brewin, N.J., y Kannenberg, E.L. (1996) Isolation of monoclonal antibodies reacting with the core component of lipopolysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 and mutant derivatives. *J Bacteriol* **178**: 2727-2733.
- Lugtenberg, B.J., Dekkers, L., y Bloemberg, G.V. (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 461-490.
- Maki, M., y Renkonen, R. (2004) Biosynthesis of 6-deoxyhexose glycans in bacteria. *Glycobiology* **14**: 1R-15R.
- Martínez-Romero, E. (2003) Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* **252**: 11-23.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., y Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 417-426.
- Monreal, D., Grillo, M.J., Gonzalez, D., Marin, C.M., De Miguel, M.J., Lopez-Goni, I. et al. (2003) Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun* **71**: 3261-3271.
- Newman, M.A., Dow, J.M., y Daniels, M.J. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 95-102.
- Noel, K.D., y Duelli, D.M. (2000) *Rhizobium* lipopolysaccharide and its role in symbiosis. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process*. Triplett, E.W. (ed). Wymondham: Horizon Scientific Press, pp. 415-431.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalik, H., Olivares, J., Lluch, C., y Sanjuan, J. (2002) *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 225-232.
- Ormeño-Orrillo, E. (2005) Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis. *Rev Latinoam Microbiol* **47**: 165-175.
- Ormeño-Orrillo, E., Vinuesa, P., Zuñiga-Davila, D., y Martínez-Romero, E. (2006) Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 253-262.

- Ormeño-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J., y Martínez-Romero, E. (2008) Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environmental Microbiology* **10**: 1271-1284.
- Ormeño-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J., y Martínez-Romero, E. (en prensa) Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environmental Microbiology*.
- Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M.A., Lloret, L., López, A., Martínez, J., y Martínez-Romero, E. (en preparación) Rhizobial diversity in different land use systems in the rain forest of Los Tuxtlas, Mexico.
- Parker, M.A. (2002) Bradyrhizobia from Wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* Species in Northern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2044-2048.
- Raetz, C.R., y Roderick, S.L. (1995) A left-handed parallel beta helix in the structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase. *Science* **270**: 997-1000.
- Raetz, C.R., y Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**: 635-700.
- Riccillo, P.M., Collavino, M.M., Grasso, D.H., England, R., de Bruijn, F.J., y Aguilar, O.M. (2000) A *guaB* mutant strain of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1228-1236.
- Rosenblueth, M., y Martínez-Romero, E. (2004) *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch Microbiol* **181**: 337-344.
- Samuel, G., y Reeves, P. (2003) Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr Res* **338**: 2503-2519.
- Schild, S., Lamprecht, A.K., y Reidl, J. (2005) Molecular and functional characterization of O antigen transfer in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **280**: 25936-25947.
- Segovia, L., Young, J.P.W., y Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 374-377.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L.E., Martínez-Romero, E., y Souza, V. (2003) *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 884-893.
- Tellstroem, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Kuester, H., y Niehaus, K. (2007) The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **143**: 825-837.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Valvano, M.A. (2003) Export of O-specific lipopolysaccharide. *Front Biosci* **8**: s452-471.
- Vinuesa, P., Reuhs, B.L., Breton, C., y Werner, D. (1999) Identification of a plasmid-borne locus in *Rhizobium etli* KIM5s involved in lipopolysaccharide O-chain biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol* **181**: 5606-5614.
- Whitfield, C., Amor, P.A., y Koplín, R. (1997) Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol Microbiol* **23**: 629-638.
- Young, J.P., Crossman, L.C., Johnston, A.W., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H. et al. (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**: R34.

Apéndice. Lista de cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas o plásmidos	Características relevantes ^a	Referencia
Cepas		
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	Cepa silvestre, Na ^f , sLPS ⁺ , Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol común	Martínez-Romero et al., 1991
<i>R. tropici</i> CIAT899cp	Derivada Captan ^f de CIAT899, sLPS ⁺ , Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol común	Este estudio
<i>R. tropici</i> CIAT899-E1	Mutante <i>wzt::mTn5</i> de CIAT899cp, sLPS ⁻ , Ndv ⁻ , Fix ⁻ en frijol común	Este estudio
<i>R. tropici</i> CIAT899-E2	Mutante <i>lpsβ2::mTn5</i> de CIAT899cp, sLPS ⁻ , Ndv ⁻ , Fix ⁻ en frijol común	Este estudio
<i>R. tropici</i> CIAT899-E3	Mutante <i>noeJ::mTn5</i> de CIAT899cp, sLPS ⁻ , Nod ⁻ en frijol común	Este estudio
<i>R. etli</i> CFN42	Cepa silvestre, Na ^f , sLPS ⁺ , Nod ⁺ Fix ⁺ en frijol común	Segovia et al., 1993
<i>R. etli</i> FAJ1200	Mutante <i>wzt::mTn5</i> de CFN42, sLPS ⁻ , Ndv ⁻ , Fix ⁻ en frijol común	Lerouge et al., 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Cepa silvestre, serotipo O5	Creuzenet y Lam, 2001
<i>Escherichia coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
Plásmidos		
pCR4-TOPO	Vector para clonación TA, Km ^r , Cb ^r , usado aquí como vector intermediario	Invitrogen
pRK2013	Plásmido helper para cruza triparentales	Ditta et al., 1980
pBBRMCS-5	Vector de amplio rango de hospederos, Gm ^r	Kovach et al., 1995
pFAJ1708	Vector de amplio rango de hospederos, Tc ^r	Dombrecht et al., 2001
pAGS10	<i>lpsβ1-lpsβ2</i> de <i>R. etli</i> CFN42 en pRK7813	García-de los Santos y Brom, 1997
pFAJ1248	<i>wzm-wzt</i> de <i>R. etli</i> CFN42 en pFAJ1708	Lerouge et al., 2001
pERN-E1	Fragmento 5' de <i>wzt</i> y región corriente arriba, obtenido de CIAT899-E1 mediante rescate de replicón	Este estudio
pERN-E2	Fragmento 5' de <i>lpsβ2</i> y región corriente arriba, obtenido de CIAT899-E2 mediante rescate de replicón	Este estudio
pERN-E3	Fragmento 3' de <i>noeJ</i> y región corriente abajo, obtenido de CIAT899-E3 mediante rescate de replicón	Este estudio
pCOS899-E1	Cósmido que complementa a la mutante CIAT899-E1, Tc ^r	Este estudio
pCOS899-E2	Cósmido que complementa a la mutante CIAT899-E2, Tc ^r	Este estudio
pCOS899-E3	Cósmido que complementa a la mutante CIAT899-E3, Tc ^r	Este estudio
pERN-T2	<i>wzm-wzt</i> de CIAT899 en pCR4-TOPO	Este estudio
pERN-T4	<i>wzt</i> de CIAT899 en pCR4-TOPO	Este estudio
pERN-T5	<i>lpsβ2</i> de <i>R. etli</i> CFN42 en pCR4-TOPO	Este estudio
pERN-T6	<i>algA</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en pCR4-TOPO	Este estudio
pERN-T7	<i>wbpM</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en pCR4-TOPO	Este estudio
pERN-F5	<i>wzm-wzt</i> de CIAT899 en pFAJ1708	Este estudio
pERN-B5	<i>wzt</i> de CIAT899 en pBBRMCS-5	Este estudio
pERN-B2	<i>lpsβ2</i> de <i>R. etli</i> CFN42 en pBBRMCS-5	Este estudio
pERN-B3	<i>algA</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en pBBRMCS-5	Este estudio
pERN-B9	<i>wbpM</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en pBBRMCS-5	Este estudio

a. sLPS, LPS liso; rLPS, LPS rugoso