

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada



TESIS DOCTORAL

**QUÓRUM-SENSIG EN *Bradyrhizobium japonicum*:
IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS Y
DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AUTOINDUCTORES**

CARMEN BEATRIZ NAVASCUÉS ORTEGA

Granada, 2006

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada**

**QUÓRUM-SENSIG EN *Bradyrhizobium japonicum*:
IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS Y
DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AUTOINDUCTORES**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Ciencias Ambientales
Carmen Beatriz Navascués Ortega para optar al Grado de Doctora

Fdo. Carmen Beatriz Navascués Ortega
Granada, 2006

VºBº
El Director

Fdo. Prof. Dr. D. Eulogio Bedmar Gómez
Profesor de Investigación
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada

El Prof. Dr. D. Eulogio Bedmar Gómez, Profesor de Investigación del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín CSIC-Granada,

CERTIFICA que,

El trabajo titulado “**Quórum-sensing en *Bradyrhizobium japonicum*: identificación de genes implicados y detección y purificación de autoinductores**”, ha sido realizado por la licenciada en Ciencias Ambientales D^a Carmen Beatriz Navascués Ortega en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín CSIC-Granada bajo mi dirección.

Este trabajo reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral de la Universidad de Granada.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos donde convenga a la interesada, firma en Granada, a 30 de Octubre de 2006,

Fdo. Prof. Dr. D. Eulogio Bedmar Gómez
Profesor de Investigación
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Eulogio Bedmar Gómez por haber permitido mi integración en el grupo de trabajo que dirige para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, con la que he iniciado no sólo mi labor científica sino también, y a pesar de mi juventud profesional, una nueva línea de investigación en el grupo de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos que me ha dado la oportunidad de saber las dificultades que entraña la búsqueda del conocimiento.

Al Prof. Dr. Julio Navascués Martínez por haberme enseñado lo que es amar la ciencia, a pesar de cualquier sacrificio personal y profesional, por sus buenos consejos para hacer una labor de investigación responsable y por su gran optimismo y fe en la carrera investigadora.

A la Dra. María José Lorite Ortega porque me ha formado en el buen hacer “a pie de poyata” y me ha demostrado lo duro pero atractivo, divertido y gratificante que resulta el materializar la parte experimental de la investigación. Gracias por todos tus consejos.

A las Dras. Inma Llamas y Belén Rodelas por su inestimable ayuda en la puesta a punto de las técnicas de detección de autoinductores implicados en quórum-sensing y por los buenos ratos que hemos pasado en distintos actos de índole científica.

A los Drs. Jose Justicia, Ramiro Vílchez y Belén Juárez por iniciarme en el apasionante mundo de la Química y porque me habeis ayudado sin importar horarios ni fechas en todo lo necesario para completar los capítulos de purificación de moléculas de este trabajo. Me habeis demostrado que es posible divertirse trabajando seriamente y ser buen compañero y amigo en un laboratorio.

Al Dr. Juan Sánchez Raya por su colaboración y versatilidad en el desarrollo de experimentos relacionados tanto con Microbiología como con Química. Por poner al servicio del grupo tu sabiduría y por demostrarnos la importancia de ser paciente y metódico.

A la Dra. Esperanza Fernandez por el tratamiento de las muestras de nódulos empleadas en el análisis de microscopía óptica y electrónica.

A todos los miembros del equipo del Prof. Dr. José Olivares porque desde el primero hasta el recién llegado siempre habeis estado dispuestos a ofrecer vuestra ayuda cuando os planteé cualquier duda o necesité algún material.

A todo el personal de Departamento Interfacultativo de Microbiología de la Universidad de Granada que de alguna manera ha colaborado en la elaboración de este trabajo.

A Ana, María y Quina porque me recibisteis en la EEZ me integrasteis en el mundo de los “becarios precarios” y así pude darme cuenta de que la investigación no sólo es trabajo, sino que en él, hay amigos, buenos compañeros y sobre todo personas.

A todos aquellos compañeros de la EEZ. Sois tantos que si os nombrara uno a uno seguramente mi memoria me jugaria la mala pasada de olvidar a alguien: porque me habeis ayudado, animado, o porque con vosotros he compartido una conversación sincera, un café o una celebración. Gracias por vuestros ánimos y buen humor.

A mis padres y a Julio porque sois quienes de verdad conoceis mis virtudes y defectos, mis fortalezas e inseguridades, porque sois quienes pacientemente me veis crecer personal y profesionalmente y porque esta Tesis es tan vuestra como mia. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

A Antonio. Gracias por ser quien me hace poner los pies en la Tierra y quien me ayuda a desconectar del laboratorio cuando mi salud mental ya no puede más. Por ayudarme a entender lo que significa superación y la importancia del conocimiento como tal. Gracias por ayudarme a enfocar esta última y primera etapa profesional.

A mis padres y a mi hermano

A Antonio

*“El supremo triunfo de la razón
es arrojar dudas
acerca de su propia validez”*

Miguel de Unamuno

*“En igualdad de condiciones
la explicación más sencilla
suele ser la verdadera”*

Navaja de Ockham

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Comunicación celular: Quórum sensing	19
1.2. Sistemas de comunicación celular mediados por QS	20
1.2.1. El sistema LuxR/I.....	20
1.2.1.1. Sintetasas de la familia LuxI.....	22
1.2.1.2. Reguladores transcripcionales de la familia LuxR.....	24
1.2.2. QS en bacterias Gram-positivas.....	25
1.2.3. Los sistemas LuxM/AI-1 y LuxS/AI-2.....	26
1.2.3.1. Sintetasas de la familia LuxM/AinS.....	27
1.2.3.2. Sintetasas de la familia LuxS.....	28
1.2.4. Otras moléculas implicadas en QS.....	29
1.3. Detección de AIs	30
1.3.1. Bioensayos con <i>C. violaceum</i> CV026.....	30
1.3.1.1. Bioensayo directo.....	31
1.3.1.2. Bioensayo reverso.....	31
1.3.2. Bioensayo con <i>A. tumefaciens</i> NT1-pZLR4.....	31
1.3.3. Bioensayo con <i>luxI</i> de <i>P. fisheri</i> y <i>sinI</i> de <i>S. meliloti</i>	32
1.3.4. Identificación del número de AIs mediante cromatografía en capa fina (TLC).....	33
1.3.5. Métodos químicos.....	33
1.4. QS en la interacción planta-bacteria	34
1.4.1. QS en la interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	34
1.4.1.1. QS en <i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i> A34.....	35
1.4.1.2. QS en <i>R. etli</i> CNPAF512.....	37

1.4.1.3. QS en <i>S. meliloti</i> Rm1021.....	38
1.4.1.4. QS en el género <i>Bradyrhizobium</i>	39
1.5. QS en la interacción planta-patógeno.....	42
1.5.1. QS en la interacción planta-patógeno mediante AHLs.....	42
1.5.2. QS en la interacción planta-patógeno mediante autoinductores diferentes a las AHLs.....	43
1.5.3. Otras posibilidades de regulación por QS en microorganismos fitopatógenos.....	45
1.5.4. Quorum quenching.....	46
1.5.4.1. Producción de compuestos que mimetizan a las AHLs.....	46
1.5.4.2. Producción de enzimas que inactivan las AHLs.....	47
1.5.4.3. Producción de AHLs en plantas transgénicas.....	47
2. OBJETIVOS.....	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Técnicas microbiológicas y bioquímicas.....	53
3.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos.....	53
3.1.2. Medios de cultivo.....	55
3.1.3. Antibióticos.....	57
3.1.4. Conservación de cepas bacterianas.....	58
3.1.5. Cultivo de células de <i>B. japonicum</i>	58
3.1.6. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml): Técnica de Miles-Misra (1938).....	59
3.2. Técnicas analíticas.....	60
3.2.1. Determinación de actividad β -galactosidasa.....	60
3.2.2. Determinación de proteína (Reactivo de Biorad).....	61

3.3. Técnicas de biología molecular	63
3.3.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E.coli</i> (“minipreps”).....	63
3.3.1.1. Método de Rusconi (método rápido).....	63
3.3.1.2. Método de la lisis alcalina (Sambrook et al. 1989).....	63
3.3.1.3. Método de lisis con STET (Sambrook et al. 1989).....	64
3.3.1.4. Método comercial mediante Qiaprep® Spin Plasmid.....	65
3.3.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>B. japonicum</i>	66
3.3.3. Obtención de ADN total.....	67
3.3.4. Determinación de la concentración de ADN.....	68
3.3.5. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.....	68
3.3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa.....	69
3.3.6.1. Electroforesis de ADN.....	69
3.3.6.2. Revelado de geles y fotografía.....	69
3.3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción..	69
3.3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa: Qiaex II®.....	70
3.3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.....	70
3.3.8.1. Ligación en vectores de clonación.....	70
3.3.9. Transformación de células de <i>E. coli</i>	71
3.3.9.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con RbCl.....	71
3.3.9.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	72
3.3.10. Transferencia de ADN a <i>B. japonicum</i> mediante conjugación.....	73
3.3.11. Hibridación ADN-ADN.....	73
3.3.11.1. Marcaje y comprobación de las sondas.....	73

3.3.11.2. Transferencia de ADN a filtros de nylon (Southern blot, método tradicional).....	75
3.3.11.3. Transferencia de ADN en vacío.....	76
3.3.11.4. Hibridación ADN-ADN.....	77
3.3.12. Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	78
3.3.13. Secuenciación de ADN.....	79
3.3.13.1. Obtención de clones de secuenciación.....	79
3.3.13.2. Secuenciación.....	80
3.3.13.3. Análisis informático de las secuencias de ADN y aminoácidos	81
3.4. Inoculación de plantas de soja (<i>Glycine max</i> L. Merr., cv. Williams) con <i>B. japonicum</i>.....	82
3.4.1. Esterilización de semillas y germinación.....	82
3.4.2. Solución nutritiva.....	82
3.4.3. Cultivo de plantas en jarras Leonard.....	82
3.4.4. Contenido en leghemoglobina (Lb) de los nódulos.....	83
3.4.5. Determinación de actividad β -galactosidasa en el citosol de los nódulos y en bacteroides.....	84
3.4.6. Preparación de muestras para microscopía.....	84
3.4.7. Parámetros fisiológicos de las plantas de soja.....	86
3.4.8. Determinación del contenido en nitrógeno [N].....	87
3.4.8.1. Proceso de mineralización por vía húmeda.....	87
3.4.8.2. Determinación de N.....	87
3.5. Extracción y detección de autoinductores en <i>B. japonicum</i>..	89
3.5.1. Preparación de extractos.....	89

3.5.1.1. Extracción de autoinductores de los sobrenadantes de cultivos bacterianos.....	89
3.5.1.2. Extracción de autoinductores de nódulos de soja.....	90
3.5.2. Detección de autoinductores.....	90
3.5.2.1. Bioensayos con <i>C. violaceum</i> CV026.....	90
3.5.2.2. Bioensayo con <i>A. tumefaciens</i> NT1-pZLR4.....	92
3.5.3. Separación de autoinductores mediante cromatografía en capa fina (TLC).....	93
3.5.4. Detección de autoinductores en placas TLC.....	93
3.6. Purificación de autoinductores.....	95
3.6.1. Preparación del extracto.....	95
3.6.2. Separación de fracciones.....	95
3.6.2.1. Cromatografía de líquidos en columna (LSC, liquid-solid chromatography).....	95
3.6.2.2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	97
3.6.2.2.1 Determinación del máximo de absorción.....	97
3.6.2.2.2. HPLC.....	97
3.6.3. Estructura de los compuestos con actividad autoinductora.....	98
3.6.3.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (¹ H RMN), de Carbonos (¹³ C RMN) y de Correlación Protón-Carbono (HMQC).....	98
3.6.3.2 Espectrometría de Masas (MS) de Baja y Alta Resolución.....	99
4. RESULTADOS	
4.1 Caracterización de los genes <i>luxRI</i> de <i>B. japonicum</i>	
USDA110.....	101
4.1.1. Identificación, clonación y secuenciación de los marcos abiertos de lectura <i>blr1062</i> y <i>blr1063</i>	101

4.1.1.1. Características del ORF <i>blr1062</i>	102
4.1.1.2. Características de <i>blr1063</i>	103
4.1.1.3. Obtención de una cepa mutante en <i>luxI</i>	104
4.1.1.4. Complementación de la mutante <i>luxI</i>	108
4.1.1.5. Regulación de la expresión de los genes <i>luxRI</i>	111
4.1.1.5.1. Construcción de fusiones transcripcionales P_{luxI} - <i>lacZ</i> y P_{luxR} - <i>lacZ</i>	111
4.1.1.5.2. Efecto de la densidad celular.....	116
4.1.1.5.3. Efecto de diferentes fondos genéticos.....	118
4.1.1.5.4. Efecto de la anoxia.....	119
4.1.1.5.5. Efecto del hierro.....	121
4.2. Autoinductores en <i>B. japonicum</i>	122
4.2.1. Detección.....	122
4.2.2. Cuantificación.....	123
4.2.3. Autoinductores en diferentes fondos genéticos.....	125
4.3. Autoinductores en la simbiosis <i>B. japonicum</i>-soja	128
4.3.1. Inoculación de plantas.....	128
4.3.2. Microscopía óptica y electrónica de transmisión de cortes de nódulos.....	128
4.3.3. Expresión de <i>luxI</i> en nódulos.....	132
4.3.4. Detección y cuantificación de autoinductores en nódulos.....	132
4.4. Purificación de autoinductores de <i>B. japonicum</i> USDA110.	136
4.4.1. Purificación por cromatografía de líquidos en soporte sólido (LSC).....	136
4.4.2. Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la fracción H.....	139

4.4.3. Estructura del compuesto C2.....	139
4.4.3.1. Espectrometría de masas de baja resolución (EMBR) y resonancia magnética nuclear de protones (¹ HRMN).....	139
4.4.3.2. Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³ CRMN).....	141
4.4.3.3. Resonancia magnética nuclear de correlación protón-carbono (Experiencia HMQC).....	143
4.4.4. Purificación a partir de la fracción I y J.....	144
4.4.5. Purificación a partir de la fracción K.....	144
4.4.6. Estructura del compuesto C3.....	145
4.4.6.1. Espectrometría de masas de baja resolución (EMBR) y resonancia magnética nuclear de protones (¹ HRMN).....	145
4.4.6.2. Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³ CRMN).....	147
4.4.6.3. Resonancia magnética nuclear de correlación protón-carbono (Experiencia HMQC).....	148
4.4.6.4. Resonancia magnética nuclear de correlación protón-protón (Experiencia COSY).....	150
5. DISCUSIÓN	
5.1. Genes <i>luxRI</i> de <i>B. japonicum</i>	156
5.2. Regulación de los genes <i>luxRI</i> de <i>B. japonicum</i>	158
5.2.1 Regulación en los fondos genéticos de las cepas USDA110 y 0852.....	158
5.2.2. Regulación en otros fondos genéticos.....	162
5.3. Producción de autoinductores	163
5.3.1. <i>B. japonicum</i> USDA110 y 0852 en vida libre.....	164
5.3.2. Producción de autoinductores por otras cepas en vida libre.....	166
5.4. Efecto de la inoculación de plantas de soja con la cepa de <i>B. japonicum</i> alterada en el gen <i>luxI</i>	167

6. CONCLUSIONES	169
7. BIBLIOGRAFIA	172
8. ANEXOS	
ANEXO 1	190
ANEXO 2	195
ANEXO 3	198
ANEXO 4	200

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Comunicación celular: Quórum sensing

Aunque clásicamente se ha considerado que los microorganismos del suelo se comportan como individuos aislados incapaces de relacionarse entre ellos, se ha demostrado su habilidad para percibir las condiciones ambientales que les rodean y comunicarse entre ellos mediante compuestos químicos, o autoinductores (AIs), difusibles y permeables a través de la membrana celular, que se liberan al medio. Conforme aumenta la densidad celular de la población, el autoinductor se acumula hasta que, al alcanzar una concentración determinada, se incorpora de nuevo al interior de la célula donde interacciona con proteínas activadoras de la transcripción que, a su vez, inducen la expresión de los genes específicos que regulan. Este mecanismo permite a los microorganismos coordinar su comportamiento ya que, debido a los cambios continuos que se producen en el medio, los mismos necesitan reaccionar de manera rápida para adaptarse a estos cambios y sobrevivir. Al sistema de comunicación célula-a-célula que emplea AIs producidos en respuesta a la densidad celular de la población de microorganismos, se le ha denominado “quorum sensing”, al que de ahora en adelante nos referiremos como percepción de quórum o, simplemente, QS.

Los sistemas de regulación que funcionan como mecanismo de comunicación intercelular dependiente de QS se han identificado en diversos microorganismos. En todos los casos controlan funciones de comportamiento o fisiológicas muy diversas, entre ellas, bioluminiscencia, transferencia de plásmidos por conjugación, producción de antibióticos y bacteriocinas, expresión de factores de virulencia, formación de biopelículas, motilidad, expresión de genes de la rizosfera, producción de polisacárido, etc. Todas estas funciones tienen en común que sólo se ejecutan si el número de células de la población del microorganismo es lo suficientemente alto como para asegurar el éxito del proceso (Fuqua et al. 1994).

Los fenómenos de autoinducción se describieron por primera vez en la bacteria simbiótica marina *Vibrio (Photobacterium) fischeri* para explicar la generación de bioluminiscencia en el interior de los órganos especializados que poseen algunas especies de peces y calamares con los que se asocia. En *V. fischeri*, la emisión de luz está controlada por las proteínas LuxR y LuxI. LuxI es una lactona sintasa que interviene en la producción de N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona que, al alcanzar un nivel adecuado de concentración, se une a LuxR, una proteína reguladora que, a su vez, activa

la transcripción de los genes del operón *luxCDABE* dando lugar al fenómeno de bioluminiscencia. La emisión de luz en el interior del calamar protege a *V. fischeri* del ataque de sus depredadores naturales (Visick y McFall-Ngai. 2000).

Además de LuxR/I, se han descrito otros mecanismos de QS, entre ellos los sistemas LuxM/AI-1 y LuxS/AI-2, típicos de bacterias Gram-negativas. En las Gram-positivas, los sistemas de QS se caracterizan porque sus AIs son péptidos modificados. Además, se han encontrado, aunque con menor frecuencia, otras moléculas que pueden actuar como autoinductores, tales como 4-quinolonas, dicetopiperazinas, ácido metil-dodecanoico, furanosil borato, tiolactona cíclica, ácido farnesoico, ácido palmítico, etc. (Shiner et al. 2004; Zhang y Dong, 2004; Winans y Brencic, 2005; Rodelas et al. 2006).

1.2. Sistemas de comunicación celular mediados por QS

1.2.1. El sistema LuxR/I

El mecanismo de QS, como ya se ha indicado, se describió por primera vez en *V. fischeri* para explicar la emisión de luz por esas bacterias, lo que se debe a la expresión de los genes *lux* responsables, en definitiva, del fenómeno de bioluminiscencia (Nealson et al. 1970; Nealson y Hastings, 1979). Desde entonces se ha descrito en otros microorganismos y, en todos los casos, está constituidos por un elemento regulador y una molécula autoinductora (Gonzalez et al. 2003; Pemberton et al. 2004; Reading y Sperandio, 2006).

Los genes *lux* se organizan en dos unidades transcripcionales divergentes, separadas aproximadamente por 155 pares de bases. Una de ellas contiene siete genes que forman el operón *luxICDABEG*, y la otra sólo posee el gen *luxR*. El producto de *luxI* es una homoserina lactona sintasa que interviene en la síntesis del autoinductor *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C₆-HL) y el producto de *luxR* funciona como activador transcripcional del operón *luxICDABEG*. Por tanto, LuxR cubre tanto la función de sensor/transductor de la señal como la de regulador de la respuesta a la misma (Rodelas et al. 2006).

A bajas densidades celulares de la población de *V. fischeri*, la transcripción de *luxICDABEG* y de *luxR* es escasa, aunque suficiente para que se mantenga una concentración basal de LuxR y de LuxI. Conforme aumenta la densidad celular, el AI 3-

oxo-C₆-HL se acumula en el interior celular y se libera al medio circundante. Cuando la concentración externa del AI alcanza un nivel umbral, el autoinductor pasa de nuevo al interior celular y se une a LuxR, que se dimeriza. Una vez activada, la unión de LuxR a una secuencia palindrómica de 20 pares de bases, denominada caja *lux*, de la región promotora de *luxI* incrementa la transcripción de *luxICDABEG*, lo que origina un importante aumento de la luz emitida (Figura 1.1). El incremento de luz está controlado por el complejo LuxR-autoinductor que, a su vez, regula negativamente la transcripción de *luxR*, dando lugar a una disminución de LuxR.

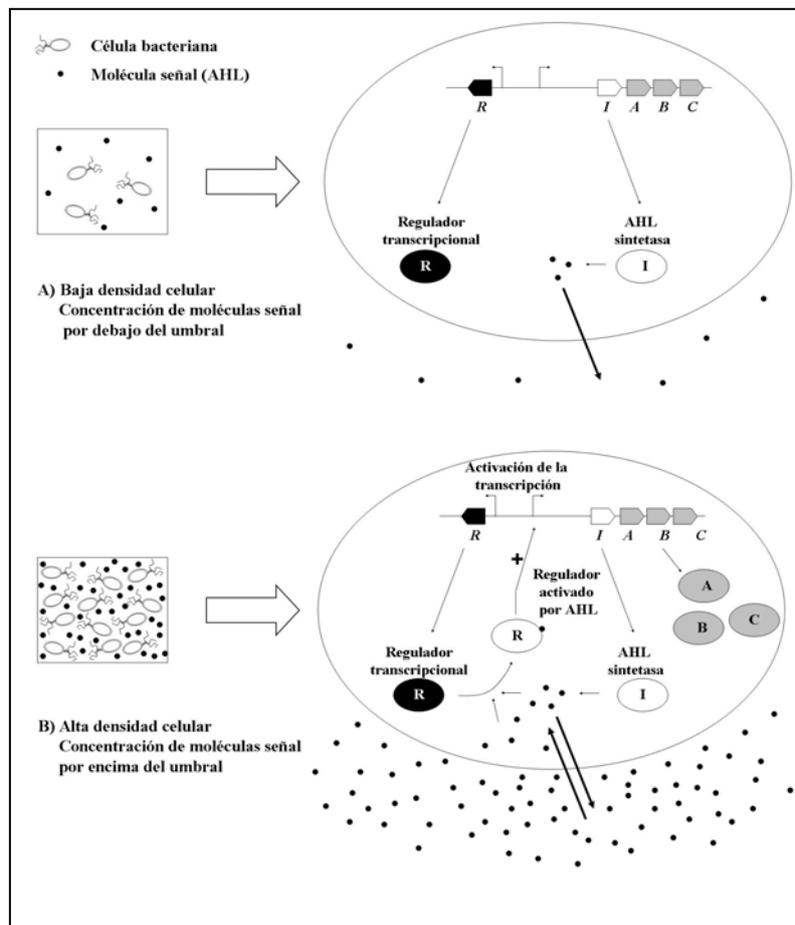


Figura 1.1. Regulación de la transcripción de los genes *lux* mediante QS (Rodelas et al. 2006). A. Cuando la densidad celular es escasa, la concentración de acil homoserina lactona (AHL) no alcanza el nivel umbral para unirse a LuxR, de manera que los genes *ABC* se transcriben a bajos niveles. B. A elevada densidad celular, el autoinductor se acumula y, al superar un umbral de concentración; activa a LuxR que, a su vez, estimula la transcripción del operón *luxICDABEG*.

1.2.1.1. Sintetas de la familia LuxI

Las proteínas sintetas de la familia LuxI catalizan la unión de S-adenosilmetionina (SAM) con una acil-proteína transportadora de acilos (acil-ACP), o lo que es lo mismo, la unión de un grupo homoserina lactona derivado del metabolismo de los aminoácidos, y una cadena acilo lateral derivada del metabolismo de los ácidos grasos, que son los dos componentes de la acil homoserina lactona (AHL) resultante (Fuqua et al. 2001, More et al. 1996, Schaefer et al. 1996) (Figura 1.2). A partir de esta base se generan diferentes AHLs caracterizadas por la longitud de su cadena acilo lateral, generalmente de 4-12 carbonos, aunque se han descrito AHLs con cadenas de hasta 18 carbonos, el tipo de sustituyente en el carbono C3, que puede ser carbonilo, hidroxilo, o totalmente reducido; y la presencia de enlaces insaturados (Rodelas et al. 2006).

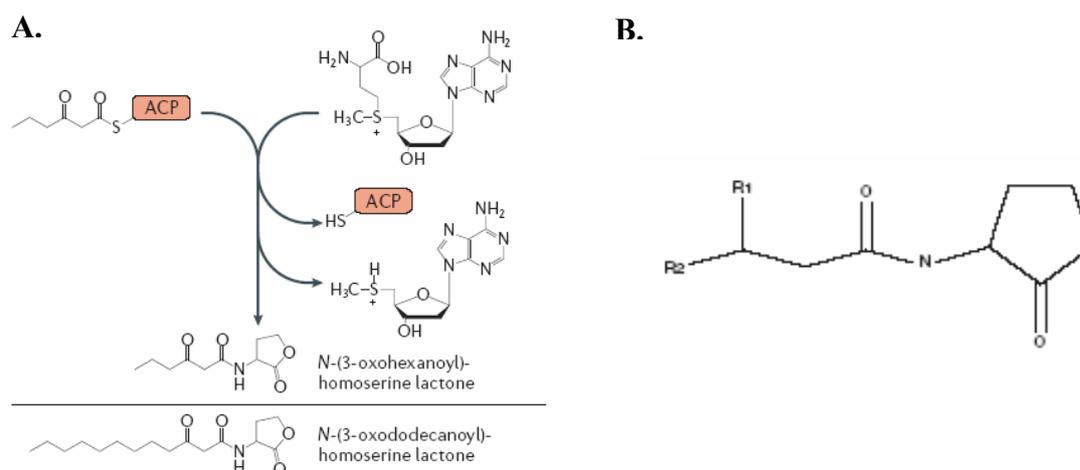


Figura 1.2. A. Reacción catalizada por proteínas de la familia LuxI. La formación de AHL tiene lugar mediante la reacción entre S-adenosil metionina (SAM) y una acil-ACP, catalizada por enzimas familia LuxI. Diferentes enzimas LuxI utilizan diferentes acil-ACP, lo que da lugar a múltiples estructuras químicas de AHLs. Se muestran las AHLs *N*-(3-oxohexanoil)-homoserina lactona y *N*-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona generadas por LuxI de *V.fischeri* y LasI de *P.aeruginosa*, respectivamente (Seller y Surette, 2006). B. Estructura básica de una AHL. R1 = O, OH ó H; R2 = C1-C18 (Rasmussen y Givskov, 2006).

La acumulación de AHLs en el medio depende tanto de su liberación al medio como de una serie de factores ambientales. Un elevado pH o la presencia de lactonasas y/o acilasas pueden disminuir el número de AHLs disponibles para activar a LuxR

(Brencic y Winans, 2005). El carácter difusible de los AHLs depende del tamaño de su cadena carbonada (Tabla 1.1). Las de cadena corta, esto es, de menos de 8 átomos de carbono difunden libremente a través de la membrana celular, mientras que AHLs de cadena larga necesitan transportadores de membrana que les permitan pasar de la célula al medio y de éste al interior celular (Kaplan et al. 1985; Pearson et al. 1999).

Compuesto Químico	Fórmula Molecular	Abreviatura/s
<i>N</i> -Butiril-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$	BHL
<i>N</i> -(3-Oxo-Butiril)-L-homoserina lactona	CH_3COCH_2	OBHL
<i>N</i> -Hexanoil-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$	HHL C ₆ -HL
<i>N</i> -(3-Oxo-Hexanoil)-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COCH}_2$	OHHL 3-oxo-C ₆ -HL
<i>N</i> -Octanoil-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6$	OHL C ₈ -HL
<i>N</i> -(3-Oxo-Octanoil)-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COCH}_2$	OOHL 3-oxo-C ₈ -HL
<i>N</i> -Decanoil-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8$	DHL C ₁₀ -HL
<i>N</i> -(3-Oxo-Decanoil)-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COCH}_2$	ODHL 3-oxo-C ₁₀ -HL
<i>N</i> -Dodecanoil-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}$	dDHL C ₁₂ -HL
<i>N</i> -(3-Oxo-Dodecanoil)-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COCH}_2$	OdDHL 3-oxo-C ₁₂ -HL
<i>N</i> -Tetradecanoil-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}$	tDHL C ₁₄ -HL
<i>N</i> -(3-Oxo-Tetradecanoil)-L-homoserina lactona	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COCH}_2$	OtDHL 3-oxo-C ₁₄ -HL

Tabla 1.1. Estructura de AHLs. Se muestra el compuesto químico, la fórmula molecular y las abreviaturas generalmente empleadas para distintas AHLs. Se ponen de manifiesto las diferencias en longitud de la cadena acilo lateral y el tipo de sustituyente del carbono C3, que puede ser carbonilo o hidroxilo.

Otras proteínas homólogas a LuxR y LuxI se han identificado en diferentes bacterias. Dichas proteínas están implicadas en la regulación por QS de fenotipos como la producción de antibióticos, factores de virulencia, exoenzimas y pigmentos, transferencia de plásmidos y agregación celular, entre otros mecanismos regulados. (Tabla 1.2).

Organismo	Sistema de regulación	AHL	Fenotipo regulado
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraR:TraI	OOHL	Transferencia del plásmido Ti
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasR:LasI	OdDHL	Producción de factores de virulencia
	RhlR:RhlI	BHL	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviR:CviI	HHL	Producción de pigmentos y factores de virulencia
<i>Erwinia carotovora</i>	CarR:CarI	OHHL	Producción de exoenzimas y antibióticos
<i>Erwinia sterwartii</i>	EsaR:EsaI	OHHL	Producción de exopolisacárido
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerR:CerI	tDeHL	Represión de agregación celular

Tabla 1.2. Caracteres regulados por QS en distintos organismos. Se indican las AHLs producidas y el fenotipo regulado en *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang et al. 1993; Fuqua y Winans, 1994), *Pseudomonas aeruginosa* (Pearson et al. 1995; Pesci e Iglewski, 1997), *Chromobacterium violaceum* (McClellan et al. 1997), *Erwinia carotovora* (Bainton et al. 1992; Pierson et al. 1999), *Erwinia sterwartii* (Von Bodman et al. 1995), *Rhodobacter sphaeroides* (Puskas et al. 1997).

1.2.1.2. Reguladores transcripcionales de la familia LuxR

Los reguladores transcripcionales de la familia LuxR se caracterizan por presentar en su extremo N-terminal un dominio de unión a AHLs, que interviene en la oligomerización de la proteína, y un dominio hélice-giro-hélice de unión al ADN en la región C-terminal. Ambos dominios implican a LuxR como regulador transcripcional (Choi y Greenberg, 1992).

La unión de la AHL a LuxR provoca su cambio conformacional y posterior dimerización. LuxR reconoce la caja *lux*, generalmente una secuencia palindrómica de 18 a 22 pares de bases que se localiza a -40 pares de bases de sitio de inicio de la transcripción de *luxI* (Egland y Greenberg, 1999). Una vez que LuxR se ha unido a la caja *lux*, se favorece la unión de la ARN polimerasa al promotor diana para activar la transcripción de los genes que regula (Stevens et al. 1994). No obstante, se han descrito sistemas de regulación que carecen de dicha secuencia (Fuqua et al. 1995; Fuqua et al. 1996). Las proteínas de la familia LuxR pueden actuar como activadores, pero también como represores de la transcripción de sus genes diana, como se describe para los fenotipos regulados por QS en *Erwinia carotovora* y *Erwinia stewartii* (Von Bodman y Farrand, 1995; Von Bodman et al. 1998; Anderson et al. 2000).

1.2.2. QS en bacterias Gram-positivas

Los sistemas de QS en bacterias Gram-positivas están regulados por péptidos de pequeño tamaño que interactúan con sistemas de dos componentes encargados, a su vez, de regular la transcripción de genes específicos. Los AIs son oligopéptidos modificados, específicos de cada sistema de regulación, y que requieren transportadores de membrana para ser exportados de la célula al medio o importados desde éste hacia el interior celular. El umbral de concentración de AIs en el medio se detecta por una proteína kinasa que inicia la fosforilación del regulador transcripcional (Reading y Sperandio, 2005).

El sistema de QS mejor estudiado es el que ocurre en *Staphylococcus aureus*, bacteria responsable de la neumonía, la endocarditis, y otras infecciones en humanos. El sistema Agr regula la producción de toxinas y proteasas. Primero, cuando la densidad celular es baja la bacteria produce proteínas implicadas en la adhesión y colonización de las áreas de infección. Posteriormente, cuando se alcanza una elevada densidad celular, se producen nuevas proteínas que intervienen en la secreción de toxinas y proteasas. En este sistema, el gen *agrD* codifica el péptido autoinductor, mientras que AgrB le incorpora un anillo tiolactónico y lo exporta hacia el medio circundante (Figura 1.3). A continuación, el AI se une a AgrC que fosforila a AgrA que, a su vez, activa la transcripción del operón *arg* y del ARN regulador, ARNIII, que reprime la expresión de los factores de adhesión y activa la expresión de proteasas y toxinas (Novick, 2003).

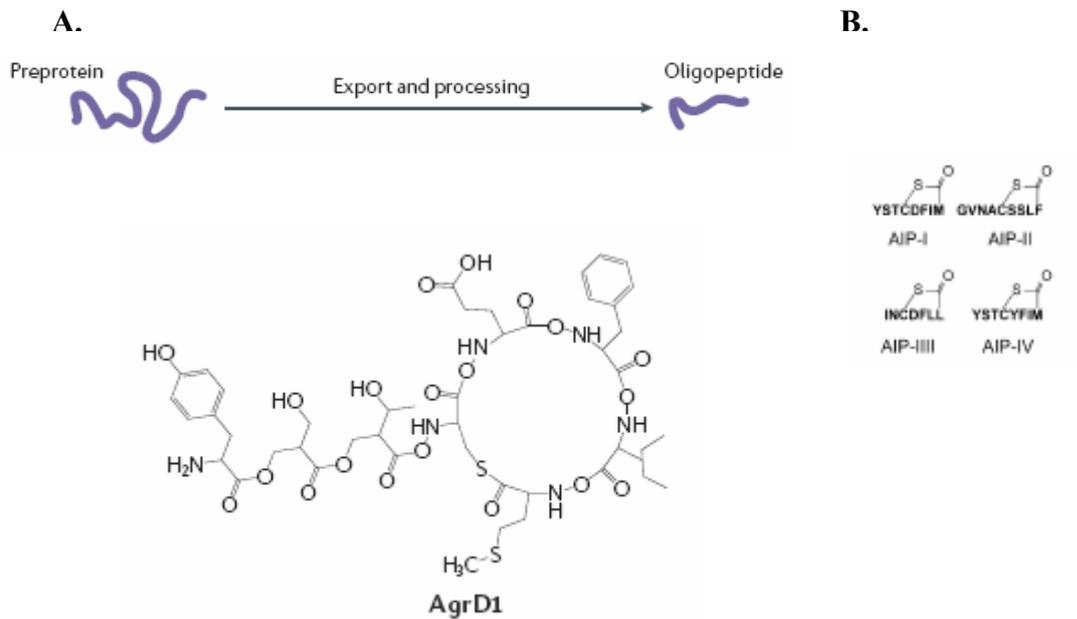


Figura 1.3. A. La producción de AgrD1 requiere la producción de una pre-proteína que requiere la unión de un anillo tiolactónico para ser activa (Séller y Surette, 2006). B. Estructura de cuatro péptidos autoinductores producidos por *S. aureus*, en los que se señala el enlace tiodiester y los correspondientes aminoácidos que une (Shiner et al. 2005).

1.2.3. Los sistemas LuxM/AI-1 y LuxS/AI-2

El sistema de QS que controla la producción de bioluminiscencia en *V. harveyi* es una mezcla de los descritos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se basa en la existencia de dos AIs, de los que el primero, AI-1 (Bassler et al. 1994), se ha identificado como una AHL sintetizada por *luxM*, y el segundo, AI-2, es una molécula furanosil borato (Chen et al. 2002) sintetizada por *luxS* (Figura 1.4). Mientras que el primer sistema, AI-1, está implicado en la comunicación entre individuos de una misma especie, AI-2 se relaciona con la comunicación entre especies porque es la tercera gran familia de autoinductores descrita y porque dichas moléculas autoinductoras son sintetizadas y reconocidas tanto por bacterias gram-negativas como por gram-positivas (Federle y Bassler 2003).

En *V. harveyi* las kinasas LuxN y LuxQ reconocen, respectivamente, a AI-1 y AI-2. Cuando no se genera señal, las kinasas fosforilan a LuxU y LuxO (Bassler et al. 1993, 1994; Freeman y Bassler, 1999; Freeman et al. 2000). P-LuxO junto con σ^{54} activa la transcripción de ARNs reguladores que desestabilizan a LuxR, de manera que es incapaz de activar el operón de la luciferasa (Lenz et al. 2004). A elevadas densidades celulares AI-1 se une directamente a LuxN, mientras que el receptor de AI-2 es la proteína periplásmica LuxP (Chen et al. 2002). A partir del momento en el que se detectan estas señales, el complejo LuxU-LuxO se desfosforila y LuxR es capaz de activar el operón de la luciferasa.

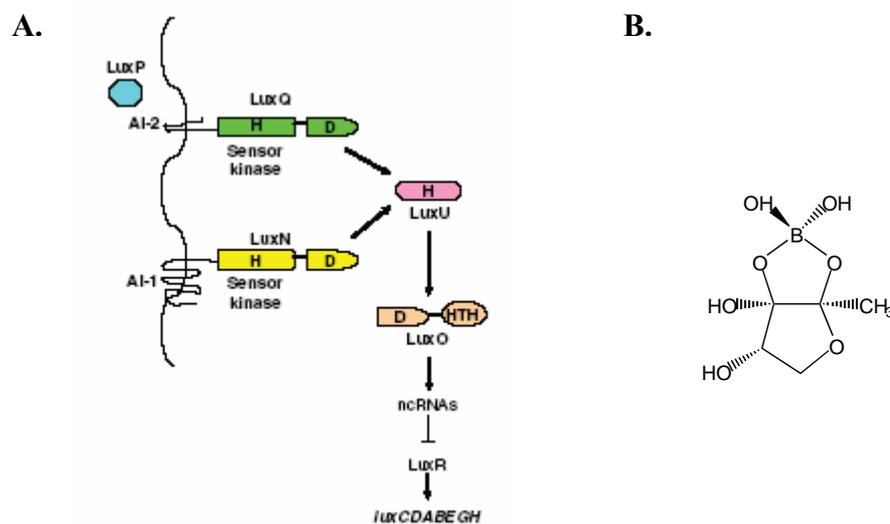


Figura 1.4. Sistemas de QS en *V. harveyi*. A. Las proteínas kinasas, LuxN y LuxQ reconocen, respectivamente, los autoinductores AI-1 y AI-2. LuxQ reconoce la presencia a elevadas concentraciones de AI-2 a través del receptor LuxP. El reconocimiento de estas señales se traduce en la defosforilación de LuxU y LuxO, permitiendo que LuxR se active para inducir la transcripción del operón *luxCDABEGH*, lo que permite la emisión de bioluminiscencia (Reading y Sperandio 2005). B. Estructura del AI furanosil borato (Zhang y Dong, 2004).

1.2.3.1. Sintetas de la familia LuxM/AinS

Los productos de los genes *luxM* de *V. harveyi* y *ainS* de *V. fischeri* intervienen en la síntesis de AHLs a pesar de no presentar homología con LuxI (Bassler et al. 1993; Gilson et al. 1995). Estas dos AHL sintetas, que comparten un dominio muy conservado, dirigen, respectivamente, la síntesis de 3-OH-C₄-HL y C₈-HL, catalizando la unión de SAM con una acil-ACP igual que lo hacen las sintetas de la familia LuxI.

Una característica particularmente significativa de AinS es que para sintetizar la molécula autoinductora C₈-HL emplea, como precursor de la cadena acílica, octanoil-ACP o bien octanoil coenzima A (octanoil-CoA) en vez de realizar dicha síntesis a partir de acil-ACP (Hanzelka et al. 1999).

1.2.3.2. Sintetas de la familia LuxS

La síntesis de AI-2 depende de *luxS*, que no presenta homología ni con *luxI* ni con *luxM/ainS*. Sintetas homólogas a LuxS se han descrito tanto en bacterias Gram-negativas, como en bacterias Gram-positivas, (Tabla 1.3). AI-2 es un furanosil borato que requiere SAM como donador metilo, a partir del que se genera S-adenosilhomocisteína (SAH). La hidrólisis de SAH resulta en adenina y S-ribosilhomocisteína (SRH) que LuxS descompone en 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD) y homocisteína. DPD sufre diversos reagrupamientos que dan lugar a los dos anillos constituidos por 5 átomos de carbono con un átomo de boro en uno de ellos, que constituyen el furanosil borato (Chen et al. 2002).

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Oceanobacillus ihayensis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>		

Tabla 1.3. Bacterias en las que se han detectado genes con homología a *luxS* (Federle y Bassler, 2003). Las bacterias que contenían algún gen con homología a *luxS* se han identificado a partir de alineamientos realizados a través del servicio de BLAST que ofrece el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

1.2.4. Otras moléculas implicadas en QS

Los AIs más comunes que intervienen en la percepción de quórum de las bacterias Gram-negativas son las AHLs. Aunque menos frecuentemente, se han identificado otras moléculas que actúan como señal autoinductora (Tabla 1.4). Dichas moléculas pueden formar parte de familias de autoinductores como las dicetopiperazinas, o ser factores de densidad celular, aisladamente detectados, que no parecen formar parte de ninguna familia genérica, como es el caso de la Bradioxetina. Además muchas de estas moléculas, están implicadas en la producción de factores de virulencia, como el ácido metildodecanoico, el éster etílico del ácido hidroxipalmítico y el ácido farnesoico (Zhang y Dong, 2004).

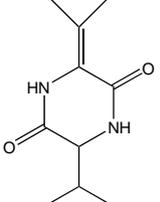
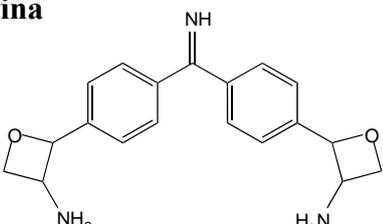
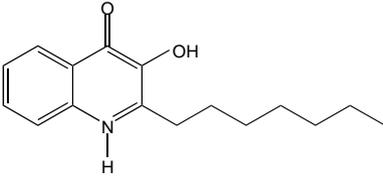
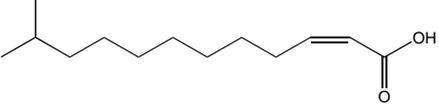
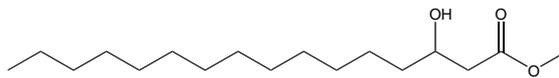
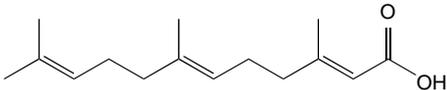
Dicetopiperazinas	Bradioxetina
Ciclo (Δ -Ala-L-Val) 	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS)	Ácido metildodecanoico (DFS)
	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
Éster etílico del ácido hidroxipalmítico (PAME)	Ácido farnesoico
	
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Candida albicans</i>

Tabla 1. 4. Principales estructuras moleculares de AIs implicados en QS (Rodelas et al. 2006).

1.3. Detección de AIs

La presencia de AIs se evalúa, de forma habitual, mediante la utilización de ensayos biológicos empleando bacterias indicadoras. Se trata de una técnica rápida, sencilla y eficaz ya que los AIs se producen, y son activos, a concentraciones muy bajas (Cha et al. 1998). Un resultado negativo no implica la ausencia de AIs en la muestra sino que puede deberse a que se superó el límite de detección de la técnica. Además, la concentración y tipo de AI en las muestras pueden alterar el resultado final del bioensayo, por lo que es necesario tener precaución en la interpretación de los datos (Martinelli et al. 2004).

Se han desarrollado biosensores capaces de detectar AIs empleando el gen *traR* de *A. tumefaciens*, *luxI* de *P. fisheri*, *sinI* de *S. meliloti*, así como el que se fundamenta en la inducción de la inhibición del pigmento púrpura violaceína que produce *Chromobacterium violaceum*. Este último método es el más utilizado por ser muy sensible y eficaz, ya que se ha demostrado que es capaz de detectar tanto AHLs con un número variable de restos de C en su cadena acílica como dicetopiperazinas.

1.3.1. Bioensayos con *C. violaceum* CV026

C. violaceum CV026 es una cepa mutada en el gen *cviI* mediante inserción del interposón Tn5 (Throup et al. 1995). A diferencia de la cepa silvestre, la cepa mutante es incapaz de producir la sintasa CviI, que interviene en la producción de 3-hexanoil homoserina lactona (C₆-HL) que, a su vez, induce la producción del pigmento púrpura violaceína (Ballantine et al. 1958; Lichstein y van de Sand, 1945). No obstante, la producción de pigmento se restaura cuando las células se incuban con un cultivo de la cepa silvestre de *Chromobacterium* productora de AHL (Throup et al. 1995) o bien cuando se agrega al medio AHL exógena (McClellan et al. 1997). Se han descrito dos tipos de bioensayos con *C. violaceum* CV026, directo y reverso, que revelan la presencia de diferentes tipos de AIs (McClellan et al. 1997).

1.3.1.1. Bioensayo directo

El ensayo directo con *C. violaceum* CV026 permite detectar la presencia de AIs exógenos procedentes de sobrenadantes bacterianos que se adicionan al medio de cultivo donde crece el bioindicador. Los AIs exógenos activan la producción de violaceína, por lo que el resultado positivo del bioensayo se corresponde con la formación de un halo violeta sobre un césped blanco-amarillento de *C. violaceum* CV026 crecido. Este bioensayo típicamente detecta AHLs de cadena acílica de menos de 8 átomos de carbono (McClellan et al. 1997).

1.3.1.2. Bioensayo reverso

El ensayo reverso permite detectar la presencia de AIs exógenos que compiten con la AHL comercial que se adiciona al medio de cultivo donde crece *C. violaceum* CV026. La adición de AHL comercial activa la producción de violaceína en *C. violaceum* CV026, mientras que los AIs exógenos que se detectan impiden la acción de la AHL comercial. El mecanismo de competencia, generalmente, se produce porque los AIs exógenos bien evitan la activación del regulador transcripcional, bien impiden su unión a la región promotora de los genes implicados en la producción de violaceína. El resultado positivo del ensayo reverso en placa, se traduce en la aparición de un halo blanco, sin producción de violaceína, con crecimiento bacteriano, sobre un fondo violáceo. Suele emplearse para detectar AHLs de cadena acílica mayor de 8 átomos de carbono. (McClellan et al. 1997)

En general, *C. violaceum* CV026 detecta muy bien BHL y es muy sensible a alkanol-HLs de cadena corta y media. Sin embargo, es poco sensible a 3-oxo-derivados y alkanol-HLs de cadena larga, y no detecta 3-hidroxi-derivados.

1.3.2. Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4

La cepa *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, que carece del plásmido Ti, está transformada con el plásmido pZLR4 que contiene una fusión *traG::lacZ* y el gen *traR* del plásmido pTiC58 (Cha et al. 1998). Por lo tanto, se trata de una cepa incapaz de producir su propio autoinductor, y en la que la fusión *lacZ* sólo se expresa en presencia de AIs exógenos. Este bioensayo es positivo cuando se presenta un halo azul, que

resulta de la degradación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) que contiene el medio de cultivo, sobre el fondo blanco correspondiente a las células crecidas de *A. tumefaciens*.

La cepa *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 es sensible principalmente a AHLs de tamaño medio, y responde con especial sensibilidad ante la presencia de OOHL por ser el tipo de sintasa TraI de *A. tumefaciens*. Detecta derivados acyl-HL de diferentes clases: 3-oxo, alkanoyl y 3-hidroxi, de 4 a 12 C de longitud de la cadena carbonada. Sin embargo este tipo de ensayo es menos efectivo para detectar la presencia de AHLs de cadena muy corta o muy larga.

1.3.3. Bioensayo con *luxI* de *P. fisheri* y *sinI* de *S. meliloti*

Este tipo de bioindicadores está constituido por fusiones transcripcionales del gen *luxI* de *P. fisheri*, por un lado, y *sinI* de *S. meliloti*, por otro, al gen *lacZ*. En estas cepas bioindicadoras, el gen implicado en la síntesis del autoinductor está mutado, mientras que el regulador transcripcional está intacto, de manera que es posible detectar actividad β -galactosidasa o actividad luciferasa, en el caso de *P. fisheri*, cuando se adiciona al medio una AHL exógena (Llamas et al. 2004).

Como ya se ha descrito anteriormente, en *V. fisheri*, la emisión de bioluminiscencia está controlada por los genes *luxR* y *luxI*. En este caso la fusión *luxI::lacZ* se construyó mediante la inserción del fragmento de ADN que contiene *luxR*, la región intergénica y la región 5' de *luxI*, en el plásmido pSUP102 (Dunlap y Kuo, 1992). El tipo de autoinductores detectados mediante sistema son los más parecidos al autoinductor 3-oxo-C₆-HL, que es el propio de esta cepa, y otras AHL de cadena corta.

Sinorhizobium meliloti es una bacteria gram-negativa que se caracteriza por su habilidad para fijar nitrógeno en la simbiosis que establece con plantas de alfalfa (*Medicago sativa*). En el cromosoma de las cepas Rm1021 y Rm41 de *S. meliloti* se ha identificado un sistema, denominado SinI, que es responsable de la síntesis de AHLs de 12 a 18 átomos de carbono en su cadena acílica. El bioindicador construido a partir de la cepa Rm1021, que contiene la fusión transcripcional *sinI::lacZ*, se obtuvo mediante simple recombinación, tras la clonación en el plásmido suicida pVIK112 (Llamas et al. 2004). La cepa bioindicadora conseguida permite detectar AHLs de cadena larga, de incluso más de 14 átomos de carbono.

1.3.4. Identificación del número de AIs mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Las técnicas biológicas de detección de AIs no permiten distinguir el número de diferentes AIs que una muestra pueda contener. De aquí, que una vez detectada la actividad autoinductora, sea necesario llevar a cabo una cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) de la misma para separar los posibles AIs. Posteriormente, la presencia de AIs la cromatoplaque se revela mediante bioensayos (McClellan et al. 1997; Cha et al. 1998).

1.3.5. Métodos químicos

Un inconveniente, como ya se ha indicado, de los bioensayos, es que no aportan información cuantitativa sobre las moléculas detectadas. Para ello, se puede recurrir a métodos químicos que, además de detectar la presencia y cantidad de AIs en la muestra, permiten la purificación de las moléculas detectadas. Los métodos químicos más empleados son la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) y el marcaje isotópico, que detectan el incremento del contenido en posibles AIs en los sobrenadantes bacterianos a medida que aumenta la densidad celular. Tienen el inconveniente de ser métodos más complejos que los bioensayos, y requieren de un aparataje más especializado (Yang et al. 2006).

Recientemente, se ha descrito un método colorimétrico para la detección de AHLs (Yang et al. 2006). Se basa en una reacción de hidrólisis del anillo lactónico que genera un compuesto coloreado cuya concentración se determina espectrofotométricamente a 520 nm de longitud de onda. El límite de detección es de, aproximadamente 1 nmol lo que hace comparable el rango de detección de otras técnicas químicas más complejas.

La eficacia del método se ha comprobado para AHLs con grupos metilo, hidroxilo y etilo en diferentes posiciones y a distintas concentraciones, y para AIs de bacterias gram-negativas y gram-positivas (Yang et al. 2006).

1.4. QS en la interacción planta-bacteria

Los mecanismos de regulación basados en QS no se restringen a las bacterias saprofitas sino que también se han descrito en aquellas que interactúan con plantas para establecer asociaciones tanto simbióticas como patogénicas. La comunicación intercelular planta-bacteria mediada por señales químicas es un hecho bien conocido. La percepción e interpretación de las señales producidas por cada uno de los elementos que interviene en la interacción da lugar a un diálogo molecular que resulta en el establecimiento de asociaciones planta-bacteria, tanto de carácter mutualista como patógeno.

1.4.1. QS en la interacción *Rhizobium*-leguminosa

Un ejemplo bien conocido de comunicación intercelular mediada por señales químicas es el que ocurre en la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. Los géneros del orden *Rhizobiales*, entre ellos, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium* tienen la capacidad de invadir las raíces de ciertas plantas leguminosas y dar lugar a la formación de nuevos órganos, los nódulos, en donde se lleva a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+). Para que el proceso ocurra, las plantas secretan al medio compuestos flavonoides que inducen la expresión en las bacterias de los denominados genes *nod*, cuyo producto, un lipoquitooligosacárido, es la señal de nodulación que, a su vez, induce en la planta el proceso de organogénesis del nódulo (Spaink, 2000; Loh y Stacey, 2003).

Está demostrado que ciertos fenómenos de la interacción *Rhizobium*-leguminosa como la eficiencia de la nodulación, desarrollo del simbiosoma, producción de exopolisacáridos y fijación de nitrógeno están regulados por QS (Tabla 1.5) (para una revisión ver González y Marketon, 2003).

Organismo	Sistema de regulación	AHL	Fenotipo regulado
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>	<i>rhiR/rhiI</i>	C6, C7, C8-HLs	Eficiencia de nodulación
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	<i>cinR/cinI</i>	AHLs de cadena corta	Fijación de nitrógeno, inhibición del crecimiento; desarrollo del simbiosoma
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	<i>traR/tral</i>	3-Oxo-C8-HL _a	Transferencia de plásmidos
<i>S. meliloti</i> Rm1021	<i>sinR/sinI</i>	C12, C16:1, 3-Oxo-C16:1, C18-HLs	Producción de exopolisacáridos

Tabla 1.5. Caracteres regulados por QS en diversas especies de *Rhizobium*. Se indican las AHLs producidas y el fenotipo regulado en *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Cubo et al. 1992; Rodelas et al. 1999), *Rhizobium etli* CNPAF512 (Lithgow et al. 2000; Rosemeyer et al. 1998), *Rhizobium etli* CFN42 (Tun-Garrido et al. 2003), *S. meliloti* Rm1021 (Marketon y González, 2002; Marketon et al. 2002).

1.4.1.1. QS en *R. leguminosarum* bv. *viciae* A34

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* A34, el microsimbionte del guisante (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens*), veza (género *Vicia*) y *Lathyrus*, se han detectado tres sistemas de QS del tipo LuxR/I, denominados CinR/I, RhiR/I, y TraR/I-BisR, que interviene, respectivamente, en la inhibición del crecimiento de otros rizobios (Lithgow et al. 2000), en la nodulación (Cubo et al. 1992), y en la transferencia del plásmido simbiótico (Wilkinson et al. 2002). Se ha descrito un cuarto sistema, denominado RaiR/I (Wisniewski-Dye et al. 2002), cuya función se desconoce. Estos sistemas se interrelacionan entre y constituyen un complejo sistema de autoregulación (Figura 1.5).

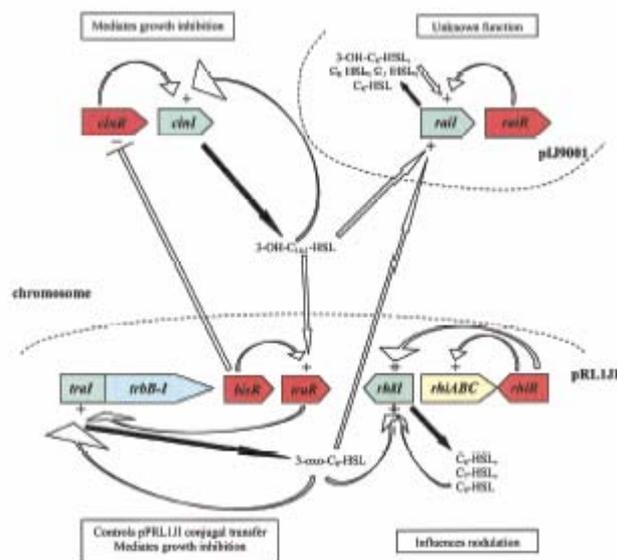


Figura 1.5. QS en *R. leguminosarum* *bv. viciae* A34 (González y Marketon, 2003). Se muestra de forma esquemática la cascada regulatoria formada por los sistemas de autoinducción CinR/I, RhiR/I, TraR/I-BisR y RaiR/I de *R. leguminosarum* *bv. viciae* A34 y la interrelación que se establece entre ellos.

El sistema CinR/I, codificado por los genes *cinRI* del cromosoma bacteriano, constituye la cúspide de la cascada regulatoria de autoinducción (Lithgow et al. 2000). Está constituido por un regulador transcripcional, CinR, y una homoserina lactona sintasa, CinI. El AI sintetizado por CinI es la AHL 3-hidroxi-C₁₄-HL, denominada también bacteriocina *small* por su capacidad para inhibir el crecimiento de otros rizobios sensibles a ella.

CinR/I se relaciona con los sistemas TraR/I-BisR, RhiR/I, y RaiR/I. El sistema TraR/I-BisR está regulado por un bucle de retroalimentación, en el que BisR impide la síntesis de 3-hidroxi-C₁₄-HL mediante la inhibición de la producción de CinR. Además, la unión de BisR a 3-hidroxi-C₁₄-HL, activa a TraR (Wilkinson et al. 2002). El sistema RhiR/I sufre una disminución de los niveles de producción de AHLs en mutantes *cinR* y *cinI*, y también se reducen los niveles de producción de otras AHLs de tamaño medio sintetizadas por el resto de sistemas de la cepa A34 (Lithgow et al. 2000). Finalmente, la inducción del sistema RaiR/I depende directamente de la AHL 3-hidroxi-C₁₄-HL.

El sistema RhiR/I, cuya síntesis se debe a los genes *rhiRI* del plásmido simbiótico pRL1J1, está compuesto por el regulador transcripcional RhiR y la homoserina lactona sintasa RhiI. La expresión de RhiR, que a su vez controla la

expresión de *rhlI* y del operón *rhlABC*, depende de la ausencia de flavonoides en el medio. RhlI interviene en la síntesis de las AHLs C₆-HL, C₇-HL y C₈-HL (Rodelas et al. 1999). El operón *rhlABC*, que se expresa en la rizosfera, parece intervenir en la eficiencia de nodulación de leguminosas durante fases tempranas del proceso simbiótico (Cubo et al. 1992).

Los genes *traR/I-bisR*, que también se localizan en el plásmido simbiótico pRL1J1, codifican las proteínas TraR/I-BisR que, al igual que LuxR/I, constituyen un sistema de regulación formado por dos activadores transcripcionales, TraR y BisR, y la homoserina lactona sintasa AHL 3-oxo-C₈-HL, de la familia TraI (Wisniewski-Dye et al. 2002). En este sistema el regulador TraR, que induce al operón *trb* implicado en la transferencia del plásmido simbiótico, se regula positivamente por BisR, previa unión del mismo a la AHL sintetizada por el sistema CinR/I. BisR interviene, a su vez, en el bucle de regulación entre ambos sistemas mediante la inhibición del sistema CinR/I.

El sistema RaiR/I está codificado por los genes *raiR/I* del plásmido no simbiótico pIJ9001. Está compuesto por el regulador RaiR y la sintasa RaiI que interviene en la producción de las AHLs C₆-HL, C₇-HL, C₈-HL y 3-hidroxi-C₈-HL. La inducción del sistema RaiR/I depende de las AHLs 3-hidroxi-C₁₄-HL y 3-oxo-C₈-HL, aunque se desconoce su función.

1.4.1.2. QS en *R. etli* CNPAF512

R. etli CNPAF512 es una bacteria simbiote de judía (*Phaseolus vulgaris*), en la que se han descrito dos sistemas de autoinducción del tipo LuxR/I, RaiR/I y CinR/I (Figura 1.6). Los genes que forman parte de dichos sistemas se localizan en el cromosoma de la bacteria e intervienen en la síntesis de siete AHLs diferentes de las que, sólo ha sido purificado e identificado uno de los productos de *cinI*, el autoinductor 3-hidroxi-acil-homoserina lactona, 3OH-(slc)-HL (Daniels et al. 2002). Sobre el resto de moléculas autoinductoras, aunque no están identificadas, se conoce que son AHLs de cadena corta e hidroxiladas de cadena larga (González y Marketon, 2003). El sistema RaiR/I está implicado en la síntesis de AHLs de tamaño medio, cuya función se desconoce aunque parece estar relacionada con el proceso de simbiosis (Rosemeyer et al. 1998). La expresión del regulador transcripcional RaiR, depende positivamente de las AHLs de cadena larga sintetizadas por CinI.

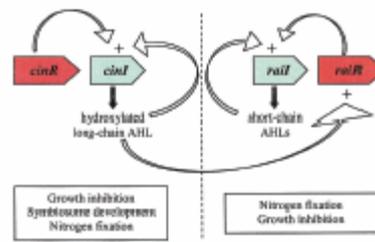


Figura 1.6. Regulación por QS en *R. etli* CNPAF512 (González y Marketon, 2003). El esquema muestra la interrelación entre los sistemas CinR/I y RaiR/I, y el tipo de AHLs que sintetizan ambos sistemas.

El sistema CinR/I sintetiza el AI 3-hidroxi-slc-HL, similar a la 3-hidroxi-C₁₄-HL, inhibidora del crecimiento de otros rizobios y también implicada en los procesos de fijación de nitrógeno y desarrollo del simbiosoma (Daniels et al. 2002).

1.4.1.3. QS en *S. meliloti* Rm1021

En *S. meliloti* Rm1021, simbiote de alfalfa (*Medicago sativa*), se han descrito dos sistemas de regulación por QS, SinR/I y Mel (Figura 1.7), ambos localizados en el cromosoma bacteriano. El primero es un sistema del tipo LuxR/I, mientras que en el segundo, que no está completamente descrito, la sintasa parece presentar homología con la proteína HdtS de *Pseudomonas fluorescens* y se desconoce su función.

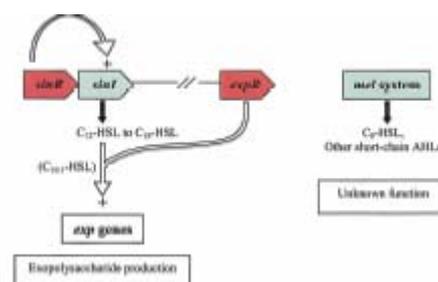


Figura 1.7. Sistemas de QS en *S. meliloti* Rm1021 (González y Marketon, 2003). El esquema muestra los sistemas regulados por QS en la cepa Rm1021 de los que se conoce que SinR/I intervienen en la fijación de nitrógeno y en la producción de exopolisacáridos.

El sistema SinR/I interviene en la producción de AHLs de cadena larga implicadas en la fijación de nitrógeno. SinR/I también se relaciona con la síntesis de exopolisacáridos del tipo EPSII cuyo papel es esencial en la fase de colonización de la raíz por la bacteria y en la formación de nódulos fijadores (Marketon et al. 2002). La producción del exopolisacárido depende de la unión del regulador ExpR al autoinductor C₁₆-HL, sintetizado exclusivamente por SinI. Por lo tanto, una cepa mutante en *sinI* es incapaz de colonizar la raíz de la planta y de formar nódulos fijadores.

1.4.1.4. QS en el género *Bradyrhizobium*

En general, los genes de la nodulación, *nod*, *nol* y *noe* son esenciales para la formación de nódulos en plantas leguminosas. Estos genes codifican una serie de enzimas que producen un lipoquitooligosacárido difusible, denominado foactor Nod, que actúa como una molécula señal de nodulación (Spaink, 2000). El factor Nod actúa como una fitohormona y es capaz de inducir cambios en la morfología de la raíz de la planta. Los genes de la nodulación se expresan en respuesta a los flavonoides producidos por la planta y su inducción está regulada, en parte, por NodD, una proteína reguladora de la familia LysR común en todos los rizobios (Gottfert et al. 1992). En *B. japonicum*, el microsimbionte de la soja (*Glycine max*), las proteínas NodW (Gottfert et al. 1990; Sanjuan et al. 1994; Loh et al. 1997) y NwsB (Grob et al. 1993; Loh et al. 2002), también activan los genes de la nodulación en presencia del isoflavonoide genisteína. Otras dos proteínas, Nola (Sadowsky et al. 1991) y NodD2 (Göttfert et al. 1991) forman un mecanismo de regulación que reprimen la expresión de los genes de la nodulación en respuesta a los niveles de la señal de nodulación (Loh y Stacey, 2001) (Figura 1.8).

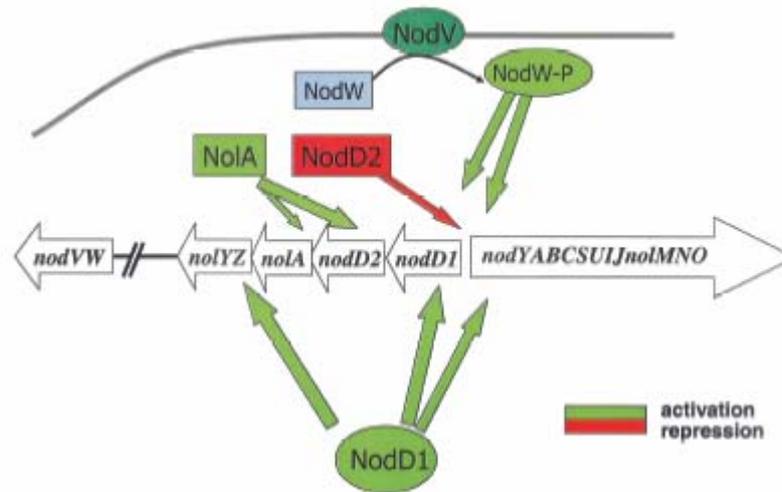


Figura 1.8. Regulación de la nodulación en *B. japonicum*. En respuesta a la genisteína, NodD1 y NodVW activan los genes *nod* responsables de la síntesis del factor de nodulación Nod. La represión de los genes *nod* se lleva a cabo por NolaA y NodD2. NolaA regula *nodD2* y NodD2 reprime los genes *nod*. Figura reproducida de Loh et al. (2003).

Posteriormente se demostró que NolaA y NodD2 modulan también la expresión de los genes *nod* de una manera dependiente de la densidad celular (Loh et al. 2001). Aunque la inducción de los genes de la nodulación fue máxima en cultivos con baja densidad celular, disminuyó drásticamente en cultivos más densos. NolaA y NodD2 median este fenotipo regulado por QS que se expresa a elevada densidad celular, cuando la capacidad para inducir los genes *nod* está más reducida. Esta dependencia de la densidad celular está ausente en una mutante *nolaA*, ya que los genes *nodYABC* están desreprimidos, incluso a elevadas densidades celulares (Loh et al. 2001). Puesto que la expresión de las fusiones *nolaA-lacZ* y *nodD2-lacZ* no se expresan en una mutante *nsw*, el control por QS de los genes *nod* implica a NwsB. Esto sugiere un papel fundamental de la proteína Nws para determinar la habilidad de los flavonoides para inducir los genes de la nodulación (Loh et al. 2002).

Stacey y colaboradores también han demostrado en *B. japonicum* USDA110 la existencia de un compuesto que se acumula conforme aumenta la densidad celular de la población, al que se ha denominado CDF (*Cell Density Factor*) (Loh et al. 2001). La purificación de CDF ha revelado que la molécula está constituida por dos anillos aromáticos unidos por un grupo imino y que cada anillo presenta un grupo aminooxetano en posición *p*. A esta molécula se le ha denominado bradioxetina y su

estructura molecular propuesta es 2-{4-[[4-(3-aminooxetano-2-il)fenil]-(imino)metil]fenil}oxetano-3-ilamina (Figura 1.9).

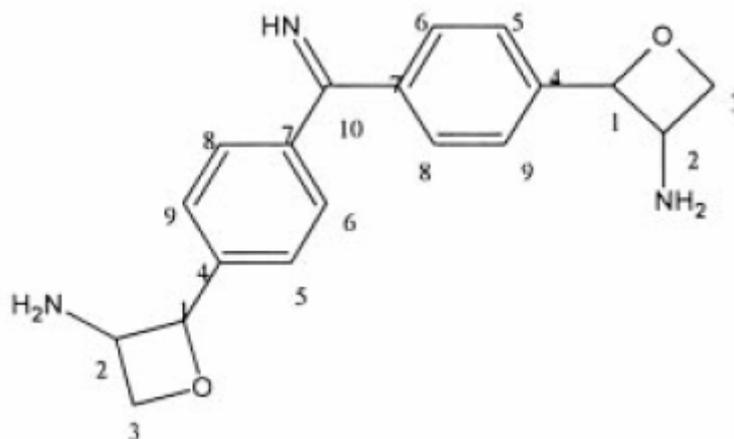


Figura 1.9. Estructura de la bradyoxetina (Loh et al. 2002).

Los mismos autores (Loh et al. 2002) han demostrado que la expresión de *nolA* se inhibe a concentraciones elevadas de Fe³ y que la síntesis de bradyoxetina depende del contenido en Fe³⁺ del medio de cultivo, por lo que han propuesto que además de actividad autinductora, la bradyoxetina pudiera funcionar como un sideróforo. De hecho, la estructura molecular de la bradiioxetina es similar a la de los sideróforos (Drechsel y Jung 1998). No obstante, se ha comprobado que, en vida libre, la bradiioxetina no es un sideróforo de alta afinidad, por lo que se ha sugerido que podría tratarse de un sideróforo específico de nódulos, cuya actividad se pondría de manifiesto en condiciones limitantes de hierro en el simbiosoma (Loh y Stacey, 2002). Que el hierro esté implicados en la regulación de la nodulación no es sorprendente, puesto que es un elemento clave para el desarrollo del nódulo (Ragland y Theil, 1993; Johnston et al. 2001) como para su funcionamiento. Además, el hierro en el nódulo es esencial para el funcionamiento de la nitrogenasa, de la oxidasa terminal *c_{bb3}* y de otros citocromos que necesitan hierro para ser activos.

La presencia de dos anillos oxetano en la bradyoxetina podrían conferirle capacidad antibiótica, dado que su estructura es similar a la del antibiótico oxetina producido por el actinomiceto *Streptomicetes* sp. OM2317 (Omura et al. 1984). La oxetina inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Pyricularia oryzae*, y es un potente herbicida que afecta a plantas de alfalfa (Omura et al. 1984). Además se ha demostrado que proteínas de la familia MerR, como lo es Nola se activan en presencia de

compuestos tóxicos, aportando a la bacteria protección frente a situaciones de estrés y una importante ventaja competitiva frente a otros rizobios en el proceso de nodulación (Thorne y Williams, 1999).

De 142 cepas de *Bradyrhizobium* analizadas para comprobar la producción de AIs mediante el empleo de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, sólo el 22% produjo AHLs. Todas las cepas con actividad autoinductora fueron de la especie *B. japonicum* y *B. elkani* y la producción de AHLs varió con el tipo de medio y el tiempo de cultivo (Pongsilp et al. 2005). Al menos una de las cepas estudiadas, *B. japonicum* USDA 290 produjo dos AI, cuya estructura podría ser de tipo AHL.

1.5. QS en la interacción planta-patógeno

1.5.1. QS en la interacción planta-patógeno mediante AHLs

Erwinia carotovora es una bacteria fitopatógena que causa la podredumbre de una gran variedad de plantas debido a que degrada los tejidos vegetales por su capacidad para producir enzimas tales como pectato liasas, poligalacturonasas, celulasas y proteasas (Jones et al. 1993; Pirhonen et al. 1993) que destruyen la pared de las células radicales. La producción de tales enzimas está regulada por QS y el AI correspondiente se ha identificado como la N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserina lactona (Bainton et al. 1992; Chatterjee et al. 1995; Jones et al. 1993; Pirhonen et al. 1993). La producción de enzimas está controlada por las proteínas ExpR y ExpI, homólogas a las proteínas LuxRI y, de hecho, cepas mutantes en el gen *expI* son incapaces de destruir los tejidos vegetales (Swift et al. 1993). *E. carotovora* tiene un segundo sistema de QS (Chatterjee et al. 1995; Cui et al. 1995) que controla la producción del antibiótico de amplio espectro carbapenemo, lo que le permite a *E. carotovora* eliminar a posibles microorganismos competidores presentes en la rizosfera.

Otra bacteria patógena que utiliza mecanismos de QS es *Agrobacterium tumefaciens*. Este microorganismo causa la formación de agallas en plantas mediante la transferencia de ADN oncogénico desde el plásmido Ti hasta el núcleo de las células vegetales. La transferencia del plásmido Ti a otros receptores está codificada por dos mecanismos. La planta produce opinas en los tumores (Dessaux et al. 1998; Piper et al. 1999) que, a su vez, inducen en las cepas de *A. tumefaciens* que son donadoras del

plásmido la producción de N-(3-oxo-octanoil)-L-homoserina lactona, cuya síntesis depende de *traI*. El autoinductor se une al regulador TraR que activa el resto de genes *tra* para que tenga lugar la transferencia de Ti (Qin et al, 2000; Fuqua y Winans, 1994).

Pantoea stewartii es el agente causal del marchitamiento del maíz, lo que se debe a la producción de grandes cantidades de un polisacárido capsular, codificado por el operón *cps*, que provoca la obstrucción del xilema y limita el transporte de agua (Braun, 1982). Los genes *cps* están regulados por la proteína EsaR cuyo efecto represor se libera en presencia de una oxo-hexanoil-homoserina lactona en cuya síntesis interviene una homoserina lactona sintasa que es el producto del gen *esaI* (Von Bodman y Farrand, 1995). Un segundo sistema de control implica a las proteínas RcsAB que constituyen un sistema que altera la síntesis del polisacárido capsular en respuesta a diferentes factores ambientales (Gottesman y Scout, 1991; Wehland et al. 1999).

Proteínas homólogas a LuxRI se han encontrado también en especies fitopatógenas de *Pseudomonas*, entre ellas PsyI en *P. syringae* patovar *tabaci*, AhII en *P. syringae* patovar *syringae* y PsmI en *P. syringae* patovar *maculicola* (Pemberton et al. 2004). En ésta última, la expresión de PsmI confiere la habilidad de producir una AHL en una cepa de *P. fluorescens* que no produce AHL. Sin embargo, la expresión simultánea de PsmI y PsmR elimina esa capacidad, lo que sugiere que la expresión del gen *psmI* está reprimida por PsmR (Pemberton et al. 2004). En *P. syringae* patovar *syringae*, que produce el moteado marrón de las alubias, se produce una oxo-hexanoil-homoserina lactona mediante la lactona sintasa AhII (Kinscherf y Willis, 1999). Una cepa mutada en *psmI* no produce AHLs y se reduce la viabilidad celular en las superficies de la planta, pero no se afecta la producción de proteasas ni del antibiótico siringomicina. Cuando las proteínas GacAS, otro sistema regulado por QS, están mutadas se afecta la motilidad de *P. syringae* patovar *syringae* pero no produce AHL. Sin embargo, cuando se elimina la síntesis de AHL, no se afecta la motilidad. Estos datos sugieren que la AHL forma parte de un sistema más complejo de reguladores intracelulares (Pemberton et al. 2004).

1.5.2. QS en la interacción planta-patógeno mediante autoinductores diferentes a las AHLs

Ralstonia solanacearum causa el marchitamiento de más de 200 especies de plantas distribuidas por todo el mundo (Schell, 2000). La bacteria invade la planta vía

radical y se disemina por el xilema en donde produce un exopolisacárido (EPS I) que bloquea el transporte del agua (Schell, 1996). Otros determinantes patogénicos de *R. solanacearum* incluyen la producción de enzimas que degradan la pared celular, la producción de sideróforos para la adquisición de hierro y la formación de flagelos. La producción de estos factores está sujeta a un complejo sistema de regulación controlado por QS. Una proteína esencial en este control es el regulador PhcA (Brumbley et al. 1993) que activa la producción de EPS I, endogluconasas y una pectina metil-esterasa, mientras que limita la producción de poligalacturonasa y la motilidad celular mediante el sistema regulador de dos componentes PehRS. De hecho, las cepas mutantes en el gen *phcA* no son patogénicas. La producción de PhcA está regulada por el éster metílico del ácido hidroxipalmitico (3-OH PAME) (Flavier et al. 1997), un AI cuya síntesis codifica el gen *phcB*. La enzima PchB contiene un motivo típico de las metiltransferasas dependientes de S-adenosil metionina, por lo que es posible que intervenga en la conversión de un ácido graso en su éster metílico volátil 3-OH PAME. El control de la expresión de gen *phA* por 3-OH PAME ocurre a través de un sistema regulador de dos componentes, en el que PhcS es el sensor y PchR es el regulador de respuesta. Cuando la densidad celular de la población es baja y, por tanto, la concentración de 3-OH PAME es escasa, PhcS fosforila a PchR que, a su vez, reprime la expresión de *pchS*. Conforme aumenta la densidad celular, se alcanza una concentración crítica de 3-OH PAME que al unirse a PchS reduce su capacidad para fosforilar a PchR, lo que inhibe la expresión de *pchA* y conduce a la activación transcripcional de los factores de patogenicidad (Pemberton et al. 2004). Este mecanismo de QS permite que en los estadios iniciales de la infección, las funciones que reprime PchA como es, por ejemplo, la motilidad no esté reprimida, ya que la misma es importante durante la colonización (Allen et al. 1997, Garg et al. 2000; Tans-Kersten et al. 2001). Una vez en el interior de la planta, la motilidad bacteriana puede perderse al no ser necesaria para el resto del proceso de infección. En esto momento, se pueden activar los factores de patogenicidad tales como la producción de EPS I y de exoenzimas que también juegan su papel en la infección una vez que la colonización se ha llevado a cabo.

En *R. solanacearum* se ha descrito, además, un segundo sistema de regulación mediante QS basado en la producción de dos AHLs (Flavier et al. 1997). Los genes *solI* y *solR* son homólogos a los genes *luxIR* y codifican compuestos que conducen a la síntesis de AHL. La expresión de *solI* requiere, a su vez, dos proteínas activadoras, RpoS y PchA. El sistema *solIR* emplea dos AIs, una N-octanoil-L-homoserina lactona y

una hexanoil homoserina lactona. Se desconoce, no obstante, los genes regulados por SolR. Este sistema, no obstante, parece estar implicado en los estadios finales de la infección.

El agente causal de la podredumbre negra de muchas crucíferas es *Xanthomonas campestris*, lo que lleva a cabo mediante la producción de una serie de enzimas que degradan la pared celular y de un exopolisacárido (EPS) compuesto por xantano (Poplawsky y Chun et al. 1997; Dow y Daniels, 1994). La regulación de estos factores de patogenicidad está controlada por dos sistemas dependientes de QS. El primer AI, al que se ha llamado DF y que posiblemente sea una butirolactona, lo producen la mayoría de las xantomonas y está sintetizado por el producto del gen *pigA* (Poplawsky y Chun, 1997). El DF activa la expresión de xantomonadina y de EPS (Poplawsky y Chun 1997). Se ha demostrado que la presencia de *pigB* en *X. campestris* es necesaria para la supervivencia epifítica de la bacteria (Poplawsky y Chun, 1998). La formación de EPS también está controlada por otro AI al que se ha denominado DSF, un compuesto cuya estructura se desconoce pero que dispara la producción de exoenzimas y de EPS mediante la activación de la transcripción del operón *rpf* (Barber et al. 1997). Los genes *rpfB* y *rpfF* codifican enzimas que intervienen en la síntesis de DSF ya que parecen codificar homologos de una CoA ligasa y de una enoil-CoA hidratasa, respectivamente, que dirigen el metabolismo de los lípidos hacia la síntesis de DSF.

Los genes *rpf* están conservados en otras especies de *Xanthomonas* y bacterias relacionadas, lo que sugiere que, aunque su contribución no es el único mecanismo de regulación que actúa sobre los genes que codifican la síntesis de exoenzimas, el sistema es de gran importancia. Se han identificado genes *rpf* en *X. axonopodis* patovar *citri*, el agente causal del cáncer de los cítricos, *X. oryzae* patovar *oryzae* que produce el cáncer del arroz y *Xylella fastidiosa* que provoca enfermedades como la clorosis variegada de los cítricos (Chatterjee y Sonti, 2002; Da Silva et al. 2001).

1.5.3. Otras posibilidades de regulación por QS en microorganismos fitopatógenos

Durante los estudios de QS en *P. harveyi* se ha puesto de manifiesto la existencia de dos AIs, uno denominado AI-1, que se identificó como 3-hidroxi-butanoil homoserina lactona (Bassler et al. 1994), y un segundo AI al que se nombró AI-2 y se ha identificado como furanosil borato diéster (Chen et al. 2002). Además de controlar la expresión de luminiscencia en *P. harveyi*, AI-2 también regula la expresión de genes de

patogenicidad en *V. cholerae*, *Clostridium perfringens* y *Streptococcus pyogenes*, la incorporación de Fe al interior celular de *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, la producción de antibióticos en *Photobacterium luminescens*, la motilidad en *Campylobacter jejuni*, etc (Federle y Bassler 2003). Puesto que AI-1 es específico de *P. harveyi* y la presencia de AI-2 se ha demostrado en más de 40 especies diferentes de bacterias Gram positivas y Gram negativas, se ha indicado que *P. harveyi* utilizaría AI-1 para la comunicación intraespecífica con otros microorganismos, mientras que AI-2 actuaría como un compuesto de señalización universal para la comunicación entre especies (Federle y Bassler 2003).

1.5.4. Quorum quenching

Los sistemas de control que regulan la interacción planta-microorganismo basados en QS representan un claro objetivo para tratar de controlar las enfermedades que producen los microorganismos fitopatógenos. Se han descrito varios sistemas que pueden interrumpir la interacción planta-patógeno mediada por QS, aunque ninguno de ellos se ha desarrollado para su empleo a gran escala. En vívido contraste, a los sistemas que permiten el control de enfermedades mediante la manipulación de los fenómenos regulados por QS se han denominado quorum quenching (QQ) Entre ellos, caben destacar los siguientes:

1.5.4.1. Producción de compuestos que mimetizan a las AHLs

Una posible estrategia en el control de enfermedades de plantas implica el empleo de compuestos “imitadores” de las AHLs, que no hay que olvidar son los AIs más extendidos. Este es el caso de una furanona halogenada producida por el alga roja marina *Delisea pulchra*. Las furanonas, que muestran homología estructural con las AHLs (Zhang y Dong, 2004), inhiben la producción de carbapeneno en *E. carotovora* y la síntesis de violaceína inducida por AHL en *Chromobacterium violaceum*. Aún más interesante es que algunas plantas, como la veza, guisante, soja, etc. también producen compuestos que imitan o remedan las AHLs. Aunque tales compuestos no se han identificado, el descubrimiento es significativo ya que demuestra que el bloqueo del AI producido por un patógeno podría utilizarse como un mecanismo de defensa contra ese mismo patógeno.

1.5.4.2. Producción de enzimas que inactivan las AHLs

Las infecciones controladas por QS podrían limitarse por la presencia en el suelo de degradasas que eliminen los AHLs u otro tipo de AIs. De esta manera, la población bacteriana sería incapaz de determinar o reconocer su tamaño y los procesos de patogenicidad regulados por QS no se inducirían. La presencia de degradasas se ha demostrado en *Variovorax paradoxus*, *Bacillus* sp. 240B1 y *A. tumefaciens*. La degradasa producida por *Bacillus* sp. 240B1, denominada AiiA (Dong et al. 2002), es una enzima nueva que no presenta homología con las secuencias de otras enzimas depositadas en las Bases de Datos. La enzima AiiA es capaz de abrir el anillo de la homoserina lactona, disminuyendo su actividad autoinductora en más de 1000 veces (Dong et al. 2001), por lo que se la considera como una AHL-lactonasa. Proteínas homólogas a AiiA se han descubierto en *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. mycoides* (Dong et al. 2002; Lee et al. 2002; Reimann et al. 2002). También se ha descrito la producción de AHL-lactonasas en *A. tumefaciens* que es Gram negativa (Zhang et al. 2002). Las AHL-lactonasas son capaces de degradar las AHLs producidas por bacterias fitopatógenas y reducir su concentración a niveles no perjudiciales. Así, la expresión del gen *aiiA* en *E. carotovora* patovar *carotovora* redujo los niveles de producción de AHL y disminuyó drásticamente su patogenicidad (Dong et al. 2000). Recientemente, se ha descrito la existencia en *Ralstonia* sp XJ12B de una AHL-acilasa que hidroliza el enlace amida entre la cadena acílica y la homoserina (Lin et al. 2003). Una búsqueda en los Bancos de Datos de enzimas homólogas a las AHL-acilasas indica que este tipo de enzimas parece conservado en diferentes especies bacterianas.

1.5.4.3. Producción de AHLs en plantas transgénicas

Una posible respuesta al por qué las bacterias fitopatógenas necesitan sistemas de QS para producir la infección, es que de esa manera se impide una infección prematura que puede disparar una respuesta local, o sistémica, de defensa de la planta. Sólo cuando la densidad de la población es elevada, de manera que se puedan superar las defensas de la planta y establecer la infección, el patógeno lleva a cabo el ataque de manera coordinada entre todos los individuos que componen la población (Pemberton et al. 2004). En este sentido, se han transformado plantas de patata y tabaco con los genes

yenI y *expI* de *Yersinia enterocolitica* y *E. carotovora* patovar *carotovora*, respectivamente. Ambos genes codifican la misma función, esto es, la síntesis de 3-oxo-C6-homoserina lactona que regula la producción de factores de patogenicidad en *E. carotovora*. Mientras que las plantas de tabaco transformadas con *expI* mostraron mayor resistencia a la infección, las plantas de patata transformadas con *yenI* fueron más susceptibles a la infección que las plantas control no transformadas (Mäe et al. 2001; Fray, 2002). Estos resultados pueden explicarse si se considera que la intensidad y la velocidad de la respuesta de la defensa a la infección pueden variar entre distintos tipos de plantas. También es posible que la concentración de AHL que dispara el proceso de infección pueda variar entre las especies de plantas.

2. OBJETIVOS

Está bien establecido que los genes de la nodulación no se expresan en el interior de los nódulos (Schlaman et al. 1991), aunque se desconocen los mecanismos responsables de esa represión. Las bacterias se encuentran empaquetadas en los simbiosomas de la región infectada de los nódulos, lo que se asemeja a un ambiente de elevada densidad celular, por lo que se ha sugerido (Loh et al. 2001) que esta situación podría originar la represión de los genes de la nodulación mediante QS.

En *R. leguminosarum* biovar *viciae* se produce una bacteriocina cuya síntesis ocurre cuando la proteína CinR induce la expresión de *cinI* en respuesta al AI 3OH-C_{14:1} homoserín lactona (Gray et al. 1996). A su vez, *cinRI* regula la expresión de los genes *rail/raiR*, *traI/traR* y *rhiI/rhiR*. La mutación en uno cualquiera de los genes *cinI* o *cinR* reduce la expresión de *rail/raiR* (Lithgow et al. 2000), lo que resulta en la disminución del número de nódulos que la bacteria forma en las raíces de veza (*Lathyrus sativa*) (Cubo et al. 1992). En *S. meliloti* se ha identificado un grupo de genes del tipo *luxRI*, denominado *sinRI*, cuya mutación afecta la síntesis de EPSII, un exopolisacárido que se requiere para la formación de nódulos activos, lo que resulta en la disminución del número de nódulos formado en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), y sugiere una implicación de la regulación por QS en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa (Marketon et al. 2003). Igualmente, la mutación de los genes *cinIR* de *R. etli* produce una disminución en la fijación simbiótica de N₂ (Daniels et al. 2002).

Aunque se ha indicado que la bradyoxetina puede ser el AI responsable de la represión de los genes de la nodulación, se desconoce si la bradyoxetina está implicada en el control por QS del establecimiento y funcionamiento de la simbiosis *B. japonicum*-soja (*Glycine max*).

De acuerdo con lo expuesto, se han planteado los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Detección y cuantificación de autoinductores en *B. japonicum* USDA110.
2. Identificación y caracterización de genes implicados en la producción de autoinductores. Obtención de cepas deficientes en la producción de autoinductores.
3. Estudio de la regulación de los genes implicados en la producción de autoinductores.
4. Efecto de la inoculación de plantas de soja con cepas de *B. japonicum* alteradas en la producción de autoinductores.

5. Detección y cuantificación de autoinductores en nódulos de soja.
6. Purificación de autoinductores producidos en vida libre y elucidación de estructuras.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Técnicas microbiológicas y bioquímicas.

3.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las Tablas 3.1 y 3.2, respectivamente.

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Bethsheda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.
S17-1	<i>hsdR</i> (RP4-2 <i>kan::Tn7 tet::Mu</i> , integrado en el cromosoma); Sm ^r Sp ^r	Simon et al. (1983)
Bioindicadores y cepa control		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1-pZLR4	<i>A. tumefaciens</i> curada del plásmido pTiC58; <i>traG::lacZ</i> , <i>traR</i> ; Gm ^r	Cha et al. (1998)
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	<i>C. violaceum cviI::mini-Tn5</i>	McClellan et al. (1997)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> A34	<i>R. leguminosarum</i> 8041, portadora del plásmido simbiótico pRL1JI	Downie et al. (1985)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
USDA110	Cepa parental; Cm ^r	Maier et al. (1978)
0852	USDA110 <i>luxI::</i> Ω ; Cm ^r , Km ^r	Este trabajo
0853	0852-BG0812; Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
A9	USDA110 <i>spc4 nifA::aphII</i> ; Sp ^r Km ^r	Fischer et al. (1986)
9043	USDA110 <i>spc4 fixK2::</i> Ω ; Sp ^r Sm ^r	Nellen-Anthamatten et al. (1998)
N5097	USDA110 <i>spc4 rpoN1::aphII rpoN2::</i> Ω ; Sp ^r , Km ^r , Sm ^r	Kullik et al. (1991)
7403	USDA110 <i>spc4 fixL::aphII</i> ; Cm ^r , Spc ^r , Km ^r	Nellen-Anthamatten y Hennecke (1998)
2426	USDA110 <i>spc4 regR::</i> Ω ; Cm ^r , Spc ^r , Sm ^r	Fischer et al. (1986)
B3	USDA110 <i>nolA::</i> Ω ; Cm ^r , Spc ^r ; Sm ^r	Garcia et al. (1996)
D21	USDA110 <i>nodD2::</i> Ω ; Cm ^r , Km ^r	Garcia et al. (1996)

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
NWS	USDA110 <i>nwsB</i> :: Ω ; Cm ^r , Spc ^r ; Sm ^r	Garcia et al. (1996)
0828	USDA110-BG0827; Cm ^r , Tc ^r	Este trabajo
0854	0852-BG0827; Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
0829	A9-BG0827; Cm ^r , Spc ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
0834	N5097-BG0827; Cm ^r , Km ^r , Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0839	9043-BG0827; Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
0840	7403-BG0827; Cm ^r , Spc ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo
0835	B3-BG0827; Cm ^r , Spc ^r ; Sm ^r	Este trabajo
0837	D21-BG0827; Cm ^r , Km ^r ; Tc ^r	Este trabajo
0838	NWS-BG0827; Cm ^r , Spc ^r ; Sm ^r	Este trabajo
0832	110-BG0831; Cm ^r , Tc ^r	Este trabajo
0855	0852-BG0831; Cm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo

Tabla 3.1. Cepas bacterianas.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación; Ap ^r	Promega®
pUC18-NotI	Vector de clonación; Ap ^r	Yanisch-Perron et al. (1985)
pHP45 Ω	Plásmido portador de los genes de resistencia a Km (interposón Ω), Km ^r	Prentki y Kirsch (1984)
pSUP202	Vector de clonación pBR325:: <i>mob</i> , <i>oriT</i> de RP4; Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r	Simon et al. (1983)
pSUP202pol4	Vector de clonación derivado de pSUP202, con el lugar de múltiple clonaje (MCS) desde <i>DraII</i> a <i>EcoRI</i> de pBSL II; Tc ^r	Fischer et al. (1993)
pSUP3535	Vector de clonación derivado de pSUP202 para la construcción de fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> ; Tc ^r	Mesa et al (2003)
pBG0801	pGEM-T con el fragmento de 2,1 kb que contiene los genes <i>lux RI</i> de <i>B. japonicum</i> ; Ap ^r .	Este trabajo
pBG0802	pUC18NotI con el fragmento <i>SaII</i> de 0,8 kb de pBG0801; Ap ^r .	Este trabajo
pBG0803	pBG0801 con el interposón Ω insertado en dirección 5'-3' en el sitio <i>BamHI</i> del gen <i>lux</i> ;	Este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
	Ap ^r , Km ^r .	
pBG0805	pSUP202 con el fragmento <i>EcoRI/PstI</i> de 4,3 kb de pBG0803; Tc ^r , Km ^r	Este trabajo
pBG0807	pUC18- <i>NotI</i> con el fragmento <i>KpnI/PstI</i> de 1,7 kb de pBG0801; Ap ^r .	Este trabajo
pBG0812	pSUP202pol4 con el fragmento <i>PstI/NotI</i> de 1,7 kb de pBG0807; Tc ^r .	Este trabajo
pBG0822	pUC18- <i>NotI</i> con el fragmento <i>EcoRI/BamHI</i> de 1,5 kb de pBG0801; Ap ^r .	Este trabajo
pBG0827	pSUP3535 con el fragemnto <i>EcoRI/PstI</i> de 1,5 kb de pBG0822; Tc ^r .	Este trabajo
pBG0833	pUC18- <i>NotI</i> con el fragmento <i>EcoRI/KpnI</i> de 0,5 kb de pBG0801; Ap ^r .	Este trabajo
pBG0831	pSUP3535 con el fragemnto <i>EcoRI/PstI</i> de 0,5 kb de pBG0833; Tc ^r .	Este trabajo

Tabla 3.2. Plásmidos.

3.1.2. Medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* y *C. violaceum* CV026 se cultivaron de forma rutinaria en medio LB (Luria-Bertani):

Medio Luria-Bertani LB (Miller 1972): NaCl, 5 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; agua desionizada, 1 l; pH 7,0 ± 0,2. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/l.. Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Mientras *E. coli* se cultivó a 37 °C, *C. violaceum* CV026 lo fue a 30 °C.

Los cultivos rutinarios de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 y *R. leguminosarum* A34 se hicieron en medio TY:

Medio TY: Triptona, 5 g; extracto de levadura, 3 g; CaCl₂ x 2H₂O, 0,9 g; agua desionizada, 1 l; pH 7,0 ± 0,2. Para preparar medio sólido se adicionó agar

bacteriológico a una concentración de 15 g/l. Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Cuando *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 se empleó como biomarcador, su cultivo se llevó a cabo en medio AB:

Medio AB (Chilton et al. 1974): Manitol 0,2%; tampón fosfato 20x, 20ml; solución salina 20x, 20 ml; agua desionizada, 1 l; pH 7,0 ± 0,2. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/l. Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Tampón fosfato (20x): K_2HPO_4 , 60 g; NaH_2PO_4 , 20 g; agua desionizada, 1 l.

Solución salina (20x): NH_4Cl , 20 g; $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,2 g; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 6 g; KCl, 3 g; $FeSO_4 \times 7H_2O$, 0,05 g; agua desionizada, 1 l; pH 7,0 ± 0,2

El tampón fosfato y la solución salina se esterizaron por separado a 120 °C durante 20 minutos. Tras enfriarse, se adicionan al resto de componentes en condiciones axénicas. El cultivo de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 y *R. leguminosarum* A34 en los medios TY y AB se realizó a 30 °C durante 24-72 horas.

Para el cultivo de *B. japonicum* se han empleado los siguientes medios:

Medio PSY (Regensburger y Hennecke, 1983): KH_2PO_4 , 0,3 g; K_2HPO_4 , 0,3 g; $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,05 g; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,1 g; extracto de levadura, 1 g; peptona, 3 g; 10 ml de solución concentrada 100x de elementos traza; agua desionizada, 1 l. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/l. Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Medio YEM (Vincent, 1970): Manitol, 5 g; NaCl, 0,1 g; extracto de levadura, 1 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,2 g; agua desionizada, 1 l; ; pH 7,0 ± 0,2. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/l. El medio YEM suplementado con 10 mM de KNO_3 se ha denominado YEMN. Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Medio BG (Bergersen, 1977): Medio mínimo para *B. japonicum*: K_2HPO_4 , 0,23 g; $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,10 g; glicerol, 4 ml; glutamato sódico, 1,1 g; 10 ml de solución concentrada 100x de elementos traza; agua desionizada, 1 l; pH $7,0 \pm 0,2$. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/l. Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Solución concentrada de elementos traza (100x): H_3BO_3 , 1g; $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,1 g; $CuSO_4 \times 5H_2O$, 0,05 g; $Mn Cl_2$, 0,05 g; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, 0,01 g; $FeCl_3$, 0,1 g; agua desionizada, 1 l.

Todos los cultivos de *B. japonicum* se realizaron a 30 °C.

3.1.3. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 μm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina y de cloramfenicol no fue necesaria la esterilización por filtración ya que se empleó alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolver los citados antibióticos. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se indica en la tabla 2.3.

ANTIBIOTICO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>B. japonicum</i>		<i>E. coli</i>
	Líquido	Sólido	Líquido y sólido
Cloruro de espectinomicina x 2H ₂ O (Spc)	100	200	25
Sulfato de estreptomicina (Sm)	100	200	25
Cloruro de tetraciclina x H ₂ O* (Tc)	50	100	10
Monosulfato de kanamicina (Km)	100	200	20
Sal sódica de ampicilina (Ap)			200
Cloramfenicol** (Cm)	20	20	50
Sulfato de gentamicina (Gm)	100	100	25

Tabla 3.3. Antibióticos. La solución concentrada de Tc se preparó en metanol:agua (1:1) o metanol dependiendo de la concentración de la misma (1 ó 10 mg/ml, respectivamente. Para la solución concentrada de Cm se utilizó etanol.

3.1.4. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. En el caso de las cepas de *B. japonicum*, se emplearon suspensiones bacterianas que se obtuvieron a partir de cultivo sólido. Los criotubos se almacenaron a - 80 °C.

3.1.5. Cultivo de células de *B. japonicum*

Los cultivos de células de *B. japonicum* se llevaron a cabo, de forma rutinaria, a partir de precultivos de 3 ml de medio líquido con los que se inocularon (dilución 1:100) volúmenes superiores de medio de cultivo. Las células se incubaron aeróbicamente en un agitador orbital (150 r.p.m.) a 30 °C durante 5-6 días.

Para los cultivos en condiciones axénicas, se emplearon tubos, matraces o frascos de diferente capacidad llenos de medio y cerrados herméticamente. El medio utilizado fue YEMN ya que *B. japonicum* puede utilizar el KNO₃, para obtener ATP en condiciones de microaerobiosis (Bedmar et al. 2005).

3.1.6. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml): Técnica de Miles-Misra (1938)

Esta técnica se utilizó para determinar el número de células vivas de suspensiones celulares de las cepas de *B. japonicum* usadas para la inoculación de plantas de soja. Para ello:

- 1.- Realizar previamente una curva de crecimiento en aerobiosis de las distintas cepas bacterianas para saber la equivalencia entre la DO_{600} y el número de células, de forma que sea posible su contaje posterior.
- 2.- Tomar alícuotas de 100 μ l de cada una de las suspensiones bacterianas a analizar de forma diaria durante todo el ensayo.
- 3.- Realizar diluciones seriadas en función de la DO_{600} .
- 4.- Seleccionar tres diluciones que se estime que puedan tener un número de células \leq 200 por 100 μ l. Depositar gotas de 20 μ l por cuatriplicado en placas de Bergersen suplementado de los antibióticos correspondientes.
- 5.- Dejar secar. Incubar a 30 °C hasta que aparezcan las colonias y sea posible su contaje.
- 6.-Una vez crecidas, elegir aquella o aquellas diluciones que tengan entre 20 y 40 colonias por gota y hacer la media aritmética. Expresar los resultados como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

3.2. Técnicas analíticas

3.2.1. Determinación de actividad β -galactosidasa

La actividad β -galactosidasa se determinó siguiendo la metodología descrita por Sambrook et al. (1989):

- 1.- Tomar alícuotas de 1,5 ó 3 ml de los cultivos aeróbicos y microaeróbicos, respectivamente ($DO_{600} = 0,3-0,5$) de *B. japonicum*. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos. Resuspender en 300 μ l de medio YEM.
- 2.- Añadir 400 μ l de tampón Z.
- 3.- Adicionar 100 μ l de cloroformo y 50 μ l de SDS al 0,1 % en tampón Z. Agitar en vórtex durante 30 s e incubar 5-10 minutos a 30 °C.
- 4.- Adicionar 150 μ l de ONPG en tampón fosfato 0,1 mM e incubar a 30 °C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Adicionar 350 μ l de CO_3Na_2 1 M .
- 5.- Centrifugar 5 minutos. Recoger el sobrenadante y determinar la absorbancia espectrofotométricamente a 420 nm.

Para la determinación de actividad β -galactosidasa cuando las muestras y/o repeticiones son numerosas, se utilizaron placas ELISA, de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1.- Tomar alícuotas de 1,5 o 3 ml de los cultivos aeróbicos y microaeróbicos, respectivamente ($DO_{600} = 0,3-0,5$) de *B. japonicum*. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos. Resuspender en 500 μ l de medio YEM.
- 2.- Depositar en cada pocillo 200 μ l de muestra. Determinar la absorbancia espectrofotométricamente a 660 nm en el lector de placas ELISA.
- 3.- Depositar 25 μ l de muestra y sus correspondientes repeticiones en pocillos diferentes.
- 4.- Adicionar a cada pocillo con muestra o repetición los siguientes reactivos:
 - 20 μ l de SDS 0,1%
 - 25 μ l de cloroformo
 - 100 μ l de tampón Z
 - 20 μ l de ONPG

5.- Incubar a 30 °C hasta que aparezca suficiente color amarillo. Adicionar 75 µl de CO_3Na_2 1 M.

6.- Determinar la absorbancia espectrofotométricamente a 420 y 550 nm en el lector de placas ELISA.

- La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller (U), de acuerdo con la fórmula: $U = \{1000 \times \text{DO}_{420}\} / \{t \text{ (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times \text{DO}_{600}\}$, donde DO_{420} y DO_{600} son los valores de DO determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo

- La actividad β -galactosidasa también se puede expresar de acuerdo con la fórmula:

$U/\text{mg proteína} = \{1000 \times \text{DO}_{420}\} / \{0,0045 \times t \text{ (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times \text{mg proteína/ml}\}$, donde 0,0045 es la absorbancia de 1 nmol de ONPG; DO_{420} y DO_{600} son los valores de DO determinados a 420 y 600 nm respectivamente; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo.

- La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller (U), cuando se ha utilizado el protocolo en placa ELISA, de acuerdo con la fórmula: $U = 1000 \times \{\text{DO}_{420} - (1,75 \times \text{DO}_{550})\} / \{t \text{ (minutos)} \times V \text{ (ml)} \times \text{DO}_{600}\}$, donde DO_{420} , DO_{550} y DO_{600} son los valores de DO determinados a 420, 550 y 600 nm respectivamente; t= tiempo de incubación; V= volumen de cultivo .

- **Tampón Z:** $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (60 mM), 1,068 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (40 mM), 0,551 g; KCl (10 mM), 0,074 g; MgSO_4 (1mM), 0,0246 g; β -mercaptoetanol (50 mM), 0,350 ml; agua destilada, 100 ml. Ajustar a pH 7,0.

- **ONPG:** 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido: 4 mg de ONPG/ml de tampón fosfato.

- **Tampón fosfato:** A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mM), 1,245 g/70 ml; B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,1 mM), 0,689g/50 ml, 39 ml. Mezclar 61 ml de A y 39 ml de B.

- **Carbonato sódico** (CO_3Na_2 , 1 M): 10,6 g/ 100ml

3.2.2. Determinación de proteína (Reactivo de Biorad)

Este método se empleó para determinar la concentración de proteína en células enteras y en extractos libres de células. En el caso de células enteras es necesario realizar el tratamiento previo de lisis que se describe a continuación:

1.-Tomar alícuotas de la muestra y adicionar 1 volumen de NaOH 1 N. Agitar en vórtex y hervir durante 20 minutos. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos para

eliminar los restos celulares. Una vez lisadas las células el protocolo es común para todo tipo de muestras.

2.- Tomar alícuotas de 25-50 μl de las muestras y completar con agua destilada hasta un volumen final de 500 μl (se aconseja una dilución 10x; si es una muestra de fracción subcelular, en la que la proteína está más concentrada, la dilución puede ser hasta 100x).

3.- Tomar alícuotas de las muestras convenientemente diluídas y completar con agua destilada hasta un volumen final de 800 μl .

4.- Adicionar 200 μl de reactivo de Bradford (Biorad).

5.- Agitar en vórtex e incubar entre 2 y 60 minutos. La concentración de proteína se calcula después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco que contiene 800 μl de agua y 200 μl del reactivo de Bradford.

La concentración de proteína se calculó mediante interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con albúmina bovina (Sigma).

3.3. Técnicas de biología molecular.

3.3.1. Obtención de ADN plasmídico de *E.coli* (“minipreps”)

3.3.1.1. Método de Rusconi (método rápido)

- 1.- Inocular 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Incubar a 37 °C durante 12-15h. Se debe incluir un cultivo de la cepa de *E. coli* portadora del vector utilizado para emplearlo como control.
- 2.- Centrifugar 200-300 µl (dependiendo del número de copias del vector utilizado) en tubos eppendorf (12.000 r.p.m., 3 minutos). Tirar el sobrenadante.
- 3.- Resuspender en 20 µl de solución de Rusconi. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Adicionar 10 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar con vórtex y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos).
- 5.- Tomar el sobrenadante y cargar directamente en un gel de agarosa.

- **Solución de Rusconi:** Tris-HCl 50 mM; EDTA 25 mM; glicerol 10% (v/v); 100 µg/ml RNAsa; una punta de espátula de lisozima y de azul de bromofenol (sólo para colorear).

3.3.1.2. Método de la lisis alcalina (Sambrook et al. 1989)

- 1.- Inocular 1,5-3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 37 °C durante 12-15 h.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 r.p.m., 3 minutos). Tirar el sobrenadante. Eliminar los restos de sobrenadante mediante el empleo de una micropunta.
- 3.- Resuspender el sedimento en 250 µl de solución I.
- 4.- Adicionar inmediatamente 250 µl de solución II. Mezclar suavemente por inversión manual de los tubos. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 350 µl de solución III. Mezclar por inversión manual varias veces y centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos).

- 6.- Recoger el sobrenadante y adicionar 1 volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar con vórtex y centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos).
- 7.- Recoger en tubos nuevos la fase superior acuosa que contiene el ADN (se diferencia de la fase inferior por ser ésta de color amarilla debido a la 8-hidroxiquinoleína de la mezcla fenólica).
- 8.- Adicionar 1,5 volúmenes de etanol al 100% preenfriado a -20 °C. Dejar 15 minutos en hielo/agua. Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos).
- 9.- Eliminar el sobrenadante. Adicionar etanol al 70% y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 10.- Secar el precipitado al vacío.
- 11.- Resuspender el precipitado en 25 µl de tampón TE o H₂O bidestilada.

- **Solución I:** Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM; 100 µg/ml RNAsa A; pH 8.

- **Solución II:** NaOH 0,2 M; SDS 1%.

- **Solución III:** Acetato potásico 3 M; pH 5,5.

- **Tampón TE:** Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0.

- **RNAsa A:** 100 µg/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. De forma previa a su utilización, la solución concentrada de RNAsa se calentó a 100 °C durante 15 minutos, se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C.

- **Mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico** (vol/vol) (25:24:1): Se prepara a partir de fenol al 100% que contenía 8-hidroxiquinoleína al 0,1% en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Se deja en agitación a oscuridad durante una noche. A continuación se prepara la mezcla con cloroformo y alcohol isoamílico en la proporción indicada.

3.3.1.3. Método de lisis con STET (Sambrook et al. 1989)

- 1.- Inocular 3 ml de medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados. Incubar en agitación (120 r.p.m.) durante 12-15 h a 37 °C.
- 2.- Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 r.p.m., 3 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 3.- Adicionar 350 µl de STET y resuspender el precipitado con el vórtex. Adicionar 5 µl de lisozima (10 mg/ml).
- 4.- Colocar los tubos en agua hirviendo durante 40 s y centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Eliminar el precipitado, que es viscoso, con un palillo higiénico.

- 5.- Adicionar 40 µl de acetato potásico 3 M pH 5,5 y dos volúmenes de isopropanol. Mantener los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 - 6.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos). Eliminar el sobrenadante. Adicionar etanol al 70% y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos).
 - 7.- Eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado al vacío.
 - 8.- Resuspender el precipitado en 40 µl de tampón TE o agua bidestilada.
-

- **STET**: Sacarosa, 8%; Tritón X-100, 0,5%; EDTA, 50 mM pH 8; Tris-HCl, 50 mM, pH 8.

3.3.1.4. Método comercial mediante Qiaprep[®] Spin Plasmid

Se realizó utilizando el producto comercial Qiaprep[®] Spin Plasmid (Qiagen Inc.), de la manera que se indica a continuación:

- 1.- Inocular 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.
- 2.- Recoger las células por centrifugación (12.000 r.p.m., 3 minutos) en tubos de microfuga. Eliminar el sobrenadante.
- 3.- Resuspender el sobrenadante en 250 µl del reactivo P1.
- 4.- Adicionar inmediatamente 250 µl del reactivo P2. Mezclar suavemente por inversión. Dejar 5 minutos como máximo a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 350 µl del reactivo N3. Mezclar por inversión varias veces. Inmediatamente centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos.
- 6.- Recoger el sobrenadante y aplicarlo a una columna Qiaprep. Centrifugar durante 1 minuto para retener el ADN plasmídico. Eliminar el eluido.
- 7.- Lavar con 750 µl de tampón PB. Centrifugar durante 1 minuto. Eliminar el eluido.
- 8.- Adicionar 750 µl de tampón PE y centrifugar 1 minuto a 12.000 r.p.m. Repetir esta operación una vez más para eliminar el exceso de tampón.
- 9.- Finalmente, colocar la columna en un tubo de 1,5 ml, adicionar 50 µl de agua bidestilada estéril, mantener 1 minuto y centrifugar (12.000 r.p.m., 1minuto) para recuperar el ADN.

- **P1**: Tris-HCl, 50 mM; EDTA, 10 mM; 100 µg/ml RNAsa A; pH 8,0.

- **P2**: NaOH 0,2 M; SDS 1%.

- **N3**: Acetato potásico 3 M; pH 5,5.

3.3.2. Obtención de ADN plasmídico de *B. japonicum*

Para la comprobación de la presencia de los plásmidos que se introdujeron en *B. japonicum* mediante conjugación con *E. coli*, se realizó el aislamiento de ADN plasmídico según el protocolo que se se detalla a continuación:

- 1.- Inocular 20 ml de medio PSY suplementado con los antibióticos correspondientes con la cepa adecuada de *B. japonicum*. Incubar a 30 °C durante 4-5 días.
- 2.- Centrifugar 5 ml (12.000 r.p.m., 3 minutos) en tubos de microfuga. Eliminar el sobrenadante y recoger el sedimento en 500 µl de NaCl 1M adicionado de sarcosil al 1%. Lavar 2 veces con NaCl 1M.
- 3.- Resuspender el sedimento en 200 µl de solución MAXI.
- 4.- Adicionar 400 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M; SDS 1%). Mezclar por inversión manual de los tubos. Esperar 10-15 minutos hasta que se observe una lisis adecuada.
- 5.- Adicionar 200 µl de acetato sódico 3 M, pH 4,8. Mezclar por inversión y mantener en hielo 15 minutos.
- 6.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 3 minutos). Recoger el sobrenadante en un tubo nuevo y adicionar un volumen de isopropanol.
- 7.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 15 minutos).
- 8.- Adicionar etanol al 70% y centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos). Eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado al vacío.
- 9.- Resuspender el precipitado en 20 µl de tampón TE pH 8,0 o agua bidestilada.

Tras el aislamiento del ADN plasmídico, debido al bajo número de copias de los plásmidos en *B. japonicum*, es difícil, por regla general, detectarlo en geles de agarosa. Por ello, el ADN obtenido se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , a partir de las cuales se obtuvo mayor cantidad de ADN plasmídico.

- **Solución MAXI:** Tris-HCl 25 mM, pH 8; glucosa, 50 mM; EDTA, 10 mM.

3.3.3. Obtención de ADN total

Para la obtención del ADN total de *B. japonicum* se empleó la siguiente metodología:

- 1.- Inocular 5 ml de medio PSY suplementado con los antibióticos correspondientes e incubar a 30 °C durante 4-5 días.
- 2.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos) en tubos eppendorf de 1,5 ml.
- 3.- Lavar con 500 µl de sarcosyl 0,1% en TE.
- 4.- Resuspender el precipitado en 1 ml de NaCl 1M.
- 5.- Mantener 30-60 minutos a 4 °C, a ser posible en agitación.
- 6.- Centrifugar (12.000 r.p.m., 2 minutos). Eliminar el sobrenadante.
- 7.- Resuspender hasta la homogeneidad en 250 µl de 20% sacarosa en tampón TE.
- 8.- Adicionar 250 µl de TE suplementado con lisozima (5 mg/ml) y ARNasa (1 mg/ml).
- 9.- Agitar en vortex e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- 10.- Añadir 100 µl de una solución preparada en TE de 5% sarkosil suplementado con pronasa (10 mg/ml).
- 11.- Incubar a 37 °C durante 1 hora.
- 12.- Adicionar 70 µl de NaAc 3M, pH 5,2.
- 13.- Adicionar 200 µl de fenol-cloroformo junto con 200 µl de cloroformo puro.
- 14.- Agitar en vortex durante 2-3 minutos. Centrifugar (12.000 r.p.m., 5 minutos) y recoger sobrenadante.
- 15.- Adicionar 300 µl de cloroformo. Agitar, centrifugar (13.000 r.p.m., 5 minutos) y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 16.- Adicionar 700 µl de isopropanol preenfriado, mezclar suavemente y llevar a -20 °C durante 15 minutos.
- 17.- Centrifugar (13.000 r.p.m., 15 minutos) y eliminar el sobrenadante
- 18.- Adicionar 500 µl de etanol al 70% y centrifugar (13.000 r.p.m., 5 minutos). Eliminar el sobrenadante cuidadosamente. Secar el precipitado al vacío.
- 19.- Resuspender el precipitado en 50 µl de tampón TE pH 8,0 diluido 10 veces o en agua bidestilada.
- 20.- Mantener a 65 °C durante 30 minutos.

3.3.4. Determinación de la concentración de ADN

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook et al. (1989). Las absorbancias A_{260} y A_{280} de las soluciones de ADN en agua o en TE se determinaron utilizando como blanco agua o TE, respectivamente. La concentración se calculó respecto a los valores estándar de $DO_{260} = 1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena doble. La relación DO_{260}/DO_{280} se utiliza como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook et al. (1989).

3.3.5. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por el proveedor (Roche®).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo, primero, la digestión con una enzima. A continuación, se añadió agua bidestilada estéril hasta un volumen mínimo de 300 μl y un volumen de mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se continuó con los pasos 6 a 10 del apartado 2.3.1.2 de esta misma sección, con la diferencia de que una vez realizada la fenolización se adicionó un 10% (v/v) de una solución de CILI 4M al sobrenadante para favorecer la precipitación del ADN. Se resuspendió en un volumen adecuado de agua bidestilada (10-20 μl) y, a continuación, se llevó a cabo la digestión con la segunda enzima.

3.3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa

3.3.6.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparada en TBE 1x (Tris 50 mM; EDTA- Na_2 2,5 mM; BO_3H_2 50 mM; pH 8,2). El tampón de electroforesis también ha sido TBE 1x. La concentración de agarosa ha sido del 0,7 % ó del 1%, según el tamaño de los fragmentos a resolver. El voltaje usual de trabajo ha sido de 100 V en cubetas de electroforesis de tamaño mediano y de 80 V en cubetas de electroforesis de tamaño pequeño. Como tampón de carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua bidestilada. El tampón de carga se emplea en proporción 1/5 con la muestra de ADN.

3.3.6.2. Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los geles en agua destilada que contenía 4-5 gotas de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), durante 15-20 minutos. Posteriormente se observaron con luz UV (260 nm) en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se han realizado con un equipo de análisis de imagen (Biorad). Alternativamente, se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509).

3.3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado teniendo en cuenta la relación logarítmica entre el tamaño molecular relativo (M_r) de las moléculas marcadoras de ADN y la movilidad relativa (R_f) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago λ resultantes de la digestión con endonucleasa *Hind*III (Marcador II) o *Eco*RI/*Hind*III (Marcador III). Cada 100 μ l de

mezcla de marcador utilizada está compuesta por 20 µl del ADN del propio marcador, 20 µl de tampón de carga y 60 µl de TE pH 8.

3.3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa: Qiaex II®

Para la purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se ha utilizado el método Qiaex-II® (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA):

- 1.- Extraer la banda correspondiente del gel de agarosa y colocarla en un tubo de microcentrífuga. Pesar la muestra para determinar el volumen de agarosa.
- 2.- Adicionar 3 volúmenes de tampón QX1®, que contiene altas concentraciones de agentes caotrópicos.
- 3.- Después, agitar en vórtex la resina Qiaex II® y adicionar 5 µl/µg de ADN e incubar a 50 °C hasta conseguir la disolución de la agarosa (aprox. 10 minutos), agitando el tubo por inversión manual cada 2 minutos.
- 4.- Centrifugar (14.000 r.p.m., 30 s). Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado, que contiene el ADN adherido a la matriz, en 0,5 ml de tampón QX1®.
- 5.- Lavar dos veces el precipitado con 0,5 ml de tampón PE® que contiene etanol para eliminar los agentes caotrópicos. Secar a temperatura ambiente, evitando una desecación excesiva porque en caso contrario no se podrá eluir bien el ADN.
- 6.- Resuspender el precipitado en 20 µl de agua bidestilada o tampón TE calentando a 50 °C durante 10 minutos.
- 7.- Eliminar la resina mediante centrifugación (14.000 r.p.m., 30 s). Recoger el sobrenadante con cuidado y pasarlo a un nuevo tubo eppendorf. Esta última operación se puede repetir una segunda vez para eluir el ADN que pudiera quedar retenido en la resina.

3.3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

3.3.8.1. Ligación en vectores de clonación

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado se realizó usando una relación molecular de al menos 1:3 de vector:inserto,

independientemente de que los extremos a ligar sean romos o cohesivos. El protocolo a seguir es el siguiente:

1.- En un tubo eppendorf, adicionar:

- x μ l de vector*
- y μ l de inserto*
- 1 μ l de DNA ligasa del fago T4 (1 unidad/ μ l)
- 2 μ l de tampón de la ligasa (concentrado 10x).
- H₂O bidestilada, completar hasta 20 μ l.

2.- Mezclar suavemente y centrifugar (1 pulso). Incubar a 4 °C durante toda la noche **.

- *Se ha de mantener la proporción vector:inserto en relación (moles) 1:3. La cantidad x+y debe ser de unos 200 ng

- **Alternativamente, aunque requiere mayor cantidad de ADN, para favorecer la eficiencia del proceso, se puede adicionara la mezcla anterior 2 μ l de PEG 8000 (40%), esterilizado a 115 °C/30 minutos. En estos casos se puede incubar durante 12-24 h a 20 °C.

3.3.9. Transformación de células de *E. coli*

3.3.9.1. Preparación de células competentes de *E. coli* con RbCl

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado según la técnica descrita por Hanahan (1983), de acuerdo con el siguiente protocolo: (Todos los pasos con las soluciones y células en hielo.)

- 1.- Cultivar *E. coli* (DH5 α , S17.1, etc.) durante la noche (12-15 h) en medio LB.
- 2.- Al día siguiente, inocular 100 ml de LB suplementado con 10 mM de MgSO₄ con 4 ml del cultivo anterior.
- 3.- Incubar a 37 °C hasta que el cultivo alcance un DO₆₀₀ de 0,4-0,6 (fase logarítmica). Detener el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 15 minutos.
- 4.- Sedimentar las células mediante centrifugación (6.000 r.p.m., 10 minutos, 4 °C) en tubos estériles de 40 ml de capacidad. Se empleó una centrifuga preparativa Sorvall.
- 5.- Tirar el sobrenadante.
- 6.- Resuspender suavemente el precipitado en 32 ml de solución RF1 estéril y preenfriada a 4 °C. Incubar en hielo durante 15 minutos.
- 7.- Centrifugar a 6.000 r.p.m. durante 10 minutos. Tirar el sobrenadante.

- 8.- Resuspender en 4 ml de solución RF2 preenfriada a 4 °C
- 9.- Repartir en alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf preenfriados a 4 °C.
- 10.- Guardar a -70 °C.

Solución RF1 (por 100 ml): 1,2 g de RbCl; 0,99 g de Mn Cl₂ x 4 H₂O; 0,294 g de acetato potásico; 0,15 g de CaCl₂ x H₂O; 11,9 ml de glicerol ; agua destilada hasta 100 ml. Ajustar el pH a 5,8 con una solución de ácido acético 0,2 M.

Solución RF2 (por 50 ml): 0,1046 g de ácido morfolino propanosulfónico (MOPS); 0,06 g de RbCl; 0,55 g de CaCl₂ x H₂O; 5,95 ml de glicerol ; agua destilada hasta 50 ml. Ajustar el pH a 6,8 con una solución diluída de NaOH.

Ambas soluciones se esterilizan mediante filtración y se guardan en oscuridad a 4° C.

3.3.9.2. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se indica a continuación:

- 1.- Descongelar las alícuotas de 100 µl de células competentes guardadas a -70 °C manteniéndolas en hielo (15-20 minutos).
- 2.- Adicionar 50-100 ng del ADN que se pretenda emplear para transformar. Mezclar mediante agitación suave e incubar en hielo durante 45 minutos.
- 3.- Calentar (choque térmico) a 42 °C durante 90-120 s. Dejar en hielo de 2 a 5 minutos.
- 4.- Adicionar medio LB hasta 1 ml. Incubar a 37 °C durante 1 h, agitando suavemente cada 20 minutos. Preparar mientras tanto placas Petri con medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos*.
- 5.- Sembrar las placas con las células transformadas. Incubar a 37 °C durante una noche.

- Si se lleva a cabo una selección por color, se puede adicionar al medio 40 µl de una solución (20 mg/ml de dimetilformamida) de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) y 4 µl de una solución (200 mg/ml) de 1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)

3.3.10. Transferencia de ADN a *B. japonicum* mediante conjugación

La transferencia de ADN a *B. japonicum* se realizó mediante conjugación biparental y se utilizó como cepa donadora *E. coli* S17.1 transformada con el plásmido que se había de transferir.

- 1.- Preparar cultivos de la cepa donadora en fase logarítmica de crecimiento y de la cepa receptora en fase exponencial tardía.
- 2.- Centrifugar 5 ml de receptor (12.000 r.p.m., 3 minutos) y, a continuación, 1 ml de donador. Eliminar el sobrenadante. Lavar 2- 3 veces con 1 ml de medio PSY.
- 3.- Resuspender el sedimento en 100 µl de PSY y adicionar la mezcla resultante a un filtro estéril de 0,45 µm de poro y 25 mm de diámetro, previamente colocados sobre placas Petri que contenían también medio PSY. Tras incubación durante 48-72 horas a 30 °C, las mezclas de conjugación se resuspendieron en 1 ml de medio Bergersen y se sembraron en placas con medio Bergersen suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes.

3.3.11. Hibridación ADN-ADN

3.3.11.1. Marcaje y comprobación de las sondas

El marcaje de sondas se ha realizado empleando el sistema no radiactivo comercializado por Roche®, siguiendo las recomendaciones del proveedor:

- 1.- En un tubo eppendorf, adicionar la cantidad de muestra necesaria que contenga entre 100 ng y 3 µg del ADN* que se quiere usar como sonda.
- 2.- Adicionar agua bidestilada estéril hasta un volumen final de 16 µl.
- 3.- Desnaturalizar el ADN por calor, sometiendo la muestra a 100 °C durante 10 minutos. Inmediatamente después, poner la muestra en hielo para evitar la renaturalización del ADN.
- 4.- Adicionar 4 µl de DIG-High Prime, mezclar y centrifugar mediante pulso. El producto comercial adicionado contiene una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica.

5.- Incubar de 1 a 20 horas a 37 °C. La eficiencia del marcaje es mayor cuanto más tiempo se mantenga la reacción.

6.- Parar la reacción mediante la adición de 2 µl de EDTA 0,2 M, pH 8, y calentando a 65 °C durante 10 minutos.

* El ADN empleado como molde para la preparación de sondas fue linear en todo caso y con una longitud entre las 200 y 1000 pares de bases. Lo más adecuado es el empleo de 1 µg de ADN durante 20 horas de reacción. El resultado será de aproximadamente 2,3 µg de ADN marcado.

En todos los casos, se comprobó la efectividad del marcaje, que se llevó a cabo de la manera siguiente:

1.- Preparar las diluciones siguientes:

- 1/20, 1/60 y 1/80 del control marcado, de manera que en la dilución 1/20 haya aproximadamente 1 ng de ADN/µl.

- 1/10, 1/30 y 1/90 de la muestra a analizar. Según el protocolo de marcaje del proveedor se han de obtener 250 ng/20 µl de ADN marcado, por lo que la dilución 1/10 tendrá una concentración aproximada de 1 ng de ADN/ µl.

2.- Disponer sobre una membrana de nylon 1 µl con su réplica de cada dilución del control y de la muestra.

3.- Fijar el ADN a la membrana de nylon mediante tratamiento con luz UV durante 1 minuto aplicada sobre la cara donde se encuentra el ADN.

4.- Incubar durante 10 minutos en 20 ml de tampón I.

5.- Incubar durante 20 minutos en 10 ml de tampón II.

6.- Incubar durante 30 minutos en 10 ml de tampón II más 1 µl de anticuerpos.

7.- Lavar con tampón de lavado 2 veces durante 5 minutos cada vez.

8.- Incubar durante 5 minutos en 10 ml de tampón III y a continuación adicionar 35 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) y 45 µl de NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride). Las manchas aparecen sobre la membrana a los pocos minutos y las diferencias de intensidad de la muestra respecto del marcador permiten estimar la concentración de la última.

- **Tampón I:** Tris-HCl 100 mM (pH 7,5); NaCl 150 mM.

- **Tampón II:** Tampón ; reactivo de bloqueo 1%.
- **Tampón III:** Tris-HCl 100 mM (pH 9,5); NaCl 100 mM

3.3.11.2. Transferencia de ADN a filtros de nylon (Southern blot, método tradicional)

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Southern (1975). Para ello:

- 1.- Realizar una electroforesis en geles de agarosa al 0,7%-1,0%. La concentración de agarosa puede variar según el tamaño de los fragmentos que se quieran separar. El voltaje depende del tamaño de la cubeta. Es conveniente emplear un voltaje bajo cuando se quiera transferir ADN total digerido con alguna enzima de restricción.
- 2.- Tinción del gel con bromuro de etidio y fotografía del mismo.
- 3.- Depurinización ácida del ADN: Sumergir el gel en HCl 0,25 N hasta viraje del azul de bromofenol a amarillo (15 minutos). Lavar con agua destilada y repetir el proceso.
- 4.- Desnaturalización alcalina del ADN: Sumergir el gel durante 15 minutos en una solución de NaOH 0,5 N adicionada de 1,5 M NaCl. Repetir el proceso. Lavar el gel con agua destilada y repetir el proceso.
- 5.- Neutralización del ADN: Sumergir el gel en Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4) adicionado de 1,5 M NaCl durante 20 minutos. Lavar con agua bidestilada y repetir el proceso.
- 6.- Humedecer una membrana de nylon (Roche®), cargada positivamente, en SSC 10x durante, al menos, 5 minutos. El tamaño de la membrana debe ser igual al del gel. Recortar también cuatro piezas de papel Whatmann 3MM del mismo tamaño y saturarlas en tampón SSC 10x.
- 7.- Sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, formar una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por una pieza de papel Whatmann 3MM, cuyos extremos, a modo de mecha se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia SSC 10x, el gel, el filtro de nylon y las tres piezas restantes de papel Whatmann 3MM. Colocar un marco de plástico que bordeé todo el sistema y, a continuación, cubrir con servilletas de papel. Sobre tales servilletas se puso una placa de vidrio y, sobre ésta, un peso de aprox. 0,5-1 kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. Comprobar que el sistema está perfectamente horizontal, y dejar la transferencia toda la noche. Finalizado el proceso, lavar la membrana con SSC 2x

durante 5 minutos. Finalmente, fijar el ADN a la membrana mediante calentamiento, en vacío, a 120 °C durante 30 minutos.

-SSC 20x: 175,3 g de NaCl; 88,2 g de citrato sódico y 800 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro.

3.3.11.3. Transferencia de ADN en vacío

Este método tiene la ventaja de ser más rápido que el anterior, ya que la transferencia se realiza en aproximadamente unas dos horas. Para ello:

- 1.- Realizar la electroforesis en las mismas condiciones que en el apartado anterior.
- 2.- Después de la electroforesis, lavar el gel con 0,25 N HCl durante 15 minutos para llevar a cabo la depurinización ácida del ADN.
- 3.- Lavar la membrana de nylon y una lámina de papel de filtro del mismo tamaño al de la membrana, primero, con agua bidestilada durante al menos 5 minutos y, después, con una solución de NaOH 0,5 N/NaCl 0,6 M. Los tamaños de la membrana y del papel debe ser iguales y aproximadamente unos 5 mm mayores en anchura y largo al tamaño del gel.
- 4.- Preparar el sistema de vacío siguiendo las instrucciones del proveedor:
 - Lavar el filtro del sistema en una cubeta con agua bidestilada y colocarlo sobre la unidad de transferencia.
 - Colocar, primero el papel humedecido sobre el filtro del sistema y, sobre éste, la membrana. Por encima de la membrana se coloca una lámina de plástico provista de una abertura de tamaño similar, o ligeramente inferior, al del gel.
 - Colocar el gel de agarosa sobre la abertura de la lámina de plástico.
 - Conectar la bomba de vacío a una presión constante de 55 mbar. Hacer el vacío lentamente, comprobando que no hay escapes, al mismo tiempo que se adiciona sobre el gel una solución de NaOH 0,5 N/NaCl 0,6 M hasta cubrirlo por completo. Mantener el vacío durante 60- 90 minutos.
- 5.- Desconectar el sistema y retirar la membrana de nylon. Lavar la membrana con SSC 2x durante, al menos, 5 minutos.

6. - Secar la membrana sobre papel Whatman. Una vez seca, fijar el ADN a 120 °C, en vacío, durante 20-30 minutos.

- En lugar de depurinación, se puede favorecer la rotura del ADN por tratamiento con luz UV durante 10 minutos.

- Así mismo es posible llevar a cabo la fijación del ADN a las membranas de nylon mediante tratamiento con luz UV durante 3 minutos por la cara de la membrana en donde se encuentra el ADN.

3.3.11.4. Hibridación ADN-ADN

El proceso de hibridación cuando se utilizó ADN homólogo como sonda se efectuó de la manera que se describe a continuación:

1.- Prehibridación: Mantener la membrana de nylon inmersa en 20 ml de solución de prehibridación durante 2-6 horas, a 42 °C

2.- Hibridación: Tras eliminar la solución de prehibridación, adicionar nueva solución de prehibridación con el ADN sonda desnaturalizado por calor (100 °C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante otros 10 minutos e incubar overnight.

3.- Tras la hibridación, se realizaron los siguientes lavados:

2 x 5 minutos (100 ml) de SSC 2x; SDS 0,1% a temperatura ambiente.

2 x 15 minutos (100 ml) de SSC 0,1x; SDS 0,1% a 68 °C.

4.- Lavar 1-5 minutos en Tampón I.

5.- Incubar 30 minutos en Tampón II.

6.- Detección inmunológica: Incubar durante 30 minutos con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina diluïdos 1:10.000 en tampón II.

7.- Lavar (2 x 15 minutos) con tampón de lavado, formado por tampón I + Tween 20 0,1%.

8.- Introducir la membrana en una bolsa de plástico de un tamaño ligeramente superior, e incubar 5 minutos con tampón III

9.- Vaciar el contenido de la bolsa. Adicionar 10 ml de CSPD®* (1:100 en tampón III) e incubar 5 minutos en la oscuridad, a temperatura ambiente.

10.- Dejar escurrir la membrana sin que se seque, sellar la bolsa y exponer la membrana a una película autorradiográfica (Kodak X-Omat). El tiempo de exposición (30 minutos a 6 h) varía en función de la concentración de ADN, la homología de la sonda y la eficiencia del marcaje.

11.- Para el revelado de la películas se emplearon el revelador y el fijador de TETENAL® a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

Dejar escurrir la membrana sin que se seque, introducirla en una bolsa y sellarla. Exponer el tiempo suficiente (0,5-5 h) con la película fotosensible en oscuridad. Revelar la película.

- **Solución de prehibridación:** SSC 5x, formamida 50%, reactivo de bloqueo 2% (p/v); N-lauryl-sarcosina 0,1% y SDS 0,02% .

- **Tampones:**

- **Tampón I:** Tris-HCl 100 mM (pH 7,5); NaCl 150 mM.

- **Tampón II:** Tampón ; reactivo de bloqueo 1%.

- **Tampón III:** Tris-HCl 100 mM (pH 9,5); NaCl 100 mM

***CSPD®:** 3-(4-metoxipiro(1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo(3.3.1.1)decan)-4-il) fenil fosfato disódico.

3.3.12. Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las mezclas de reacción contenían:

ADN molde (50 ng)

5 µl de tampón PCR (10x)

1 µl de cebador Blr1063f (10 pmoles/µl)

1 µl de cebador Blr1062r (10 pmoles/µl)

1,5 µl de MgCl₂ (1,5 mM)

1 µl dNTPs (10 mM)

0,2 µl Taq polimerasa (5 U/µl)

Completar con H₂O bidestilada hasta 50 µl

El programa de PCR utilizado para la amplificación del fragmento de 2,1 kb que contenía los marcos abiertos de lectura *blr1062* y *blr1063* de *B. japonicum* se muestra a continuación:

Ciclos	Temperatura (° C)	Tiempo (minutos)
1	95	3
35	95	1
	56	1
	72	2,5
1	72	7

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

Blr1062f: 5'-*G*GAGAATTTCGACGATGATGGCGGAGTA-3'

Blr1063r: 5'-*G*ACTGCAGGTCGGAATGAAAGAAGTG-3'

La secuencia de Blr1062f y Blr1063r corresponden, respectivamente, a las comprendidas entre los nucleótidos 274.848 a 274.866 y 277.021 a 277.003 de la secuencia del genoma de *B. japonicum* USDA110 (Kaneko et al. 2002; ver <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). Las secuencias se completaron con la adición de los nucleótidos GA (en cursiva), y de las secuencias de corte que reconocen las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* (subrayadas), para facilitar posteriores estrategias de clonación.

La síntesis de los cebadores Blr1062f y Blr1063r se llevó a cabo en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, utilizando el sintetizador modelo AB3400 DNA Synthesizer 1.3. de Applied Biosystems.

3.3.13. Secuenciación de ADN

3.3.13.1. Obtención de clones de secuenciación

El fragmento de 2,1 kb amplificado mediante PCR se clonó en pGEM®-T utilizando el vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega). Para ello:

1.- En un tubo eppendorf, adicionar:

- 1 µl de vector (50 ng)
- x µl de producto de PCR*

- 1 µl de DNA ligasa del fago T4 (3 unidades/µl)
- 5 µl de tampón rápido de la ligasa (concentrado 2x).
- H₂O bidestilada, completar hasta 10 µl.

2.- Mezclar suavemente y centrifugar (1 pulso). Incubar a 4 °C durante toda la noche **.

- * La proporción vector:inserto adecuada se consigue aplicando la fórmula que permite calcular la cantidad de producto de PCR necesaria: $\text{ng de inserto} = (50 \text{ ng del vector} \times \text{número de kb del inserto}) / 3 \text{ kb del vector}$.

Para secuenciar la parte central del producto de PCR, el plásmido obtenido se digirió posteriormente con *SalI* y el fragmento de ADN resultante, de 0,8 kb, se clonó en el vector pUC18*NotI* también digerido con *SalI*.

La comprobación de la ausencia de errores en el ADN se llevó a cabo mediante la secuenciación de los clones obtenidos.

3.3.13.2. Secuenciación

La secuenciación del ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo mediante el equipo automatizado de electroforesis capilar ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, utilizando la química BigDye Terminator 3.1, todo de Applied Biosystems. Se empleó el termociclador GeneAmpPCR System 9700 también de Applied Biosystems. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos.

Las mezclas de secuenciación contenían:

- 400 a 1000 ng de ADN de cadena doble
- 6,4 picomoles del cebador universal M13 (-40) o del cebador universal M13 (-20)
- Agua bidestilada hasta un volumen final de 12 µl.

Las secuencias de los cebadores M13 (-40) y M13 (-20) son, respectivamente, 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3' y (-20) 5'-AACAGCTATGACCATG-3'. Ambos

oligonucleótidos se sintetizaron en los laboratorios del Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos.

3.3.13.3. Análisis informático de las secuencias de ADN y aminoácidos

Los análisis de las secuencias de ADN y aminoácidos, búsqueda de sitios de restricción, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado a través de Internet utilizando los programas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>).

3.4. Inoculación de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams) con *B. japonicum*

3.4.1. Esterilización de semillas y germinación

- 1.- Sumergir las semillas de soja, (*Glycine max* L. Merr., cv. Williams) con alcohol al 96% (v/v) durante 30 s. Eliminar el mismo.
- 2.- Tratar las semillas con una solución de peróxido de hidrógeno de 15 volúmenes durante 8 minutos.
- 3.- Lavar 5-6 veces con abundante agua destilada estéril y colocar las semillas en placas Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril.
- 4.- Germinar en oscuridad a 30 °C durante 2-3 días, controlando la humedad diariamente.

3.4.2. Solución nutritiva

Se ha empleado la solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975), con algunas modificaciones, como se indica continuación:

- Macroelementos (por l de agua): KH_2PO_4 , 68 mg; K_2HPO_4 , 44 mg; $\text{SO}_4\text{Mg} \times 7\text{H}_2\text{O}$, 123 mg; K_2SO_4 , 174 mg; SO_4Ca , 173 mg; EDTA Férrico (Secuestrene), 25 mg.
- Microelementos (por l de agua): $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,11 mg; BO_3H_3 , 2,85 mg; $\text{SO}_4\text{Mn} \times 4\text{H}_2\text{O}$, 3,07mg; $\text{SO}_4\text{Zn} \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,55 mg; $\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2mg.

La solución se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

3.4.3. Cultivo de plantas en jarras Leonard

Una vez germinadas, las semillas de soja con un grado de desarrollo uniforme se plantaron en jarras Leonard (Leonard, 1943). De los dos componentes que forman este sistema, el superior se rellenó con vermiculita y el inferior contenía la solución mineral. En cada jarra se sembraron dos plántulas que se inocularon en el momento de la siembra con 1 ml de una suspensión de la cepa adecuada de *B. japonicum* (aprox. 10^8 células/ml).

Posteriormente, las plántulas se cubrieron con una capa de perlita que evita la posible contaminación ambiental y refleja la luz, evitando un calentamiento excesivo de

las semillas que pudiera alterar el desarrollo de las mismas. Las jarras se envolvieron en papel de confitero, opaco a la luz, para evitar que ésta alcanzara las raíces.

Las jarras Leonard se trasladaron a una cámara de cultivo de plantas donde se mantuvieron durante 35 días bajo las siguientes condiciones: $500 \mu\text{einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (longitud de onda de onda: 400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 23/17 °C de temperatura día/noche y 50% de humedad relativa. Cuando fue necesario, el reservorio inferior se rellenó con solución mineral.

3.4.4. Contenido en leghemoglobina (Lb) de los nódulos

El contenido en leghemoglobina (Lb) de los nódulos se determinó mediante fluorimetría siguiendo la técnica descrita por LaRue y Child (1979):

1. - Homogeneizar 0,3 g de nódulos en 6 ml de medio de extracción suplementado con un 10% de polivinilpirrolidona insoluble.
2. - Centrifugar el extracto resultante a 12.000 r.p.m. durante 20 minutos.
3. - Tomar alícuotas de 50 μl del sobrenadante y añadir 3,15 ml de una solución saturada (6,6 g/100 ml) de ácido oxálico
4. - Calentar las muestras a 120 °C durante 30 minutos en un autoclave.
5. – Una vez a temperatura ambiente, determinar la fluorescencia de las soluciones mediante un fluorímetro Shimadzu equipado con una lámpara xenón-mercurio y un fotomultiplicador sensible al rojo, RF-540. La longitud de onda de excitación fue de 405 nm y la del selector monocromático de emisión de 600 nm. Las diferencias entre los valores de la fluorescencia emitidos por las muestras control (no calentadas) y calentadas son proporcionales a la cantidad de hemoproteínas existentes y por tanto indicativo de la cantidad de Lb en las muestras. Como referencia se construyó una curva patrón a partir de hemoglobina de plasma humano.

Medio de extracción de leghemoglobina: Tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 50 mM pH 7,4; ferricianida potásica $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,02 % y NaH_2CO_3 0,1 %. Cubrir con papel de aluminio y conservar a 4 °C hasta su empleo.

Tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH 7,4: A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mM), 0,8003 g/90ml; B $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (50 mM), 0,1725 g/25 ml. Mezclar 81ml de A y 19 ml de B.

3.4.5. Determinación de actividad β -galactosidasa en el citosol de los nódulos y en bacteroides

La obtención del citosol de los nódulo y en bacteroides se realizó de la siguiente manera:

- 1.- Homogeneizar 1 g de nódulos con 4 ml de tampón de extracción preenfriado en hielo.
- 2.- Filtrar el extracto a través de 4 capas de gasa hidrófila.
- 3.- Centrifugar (1.500 r.p.m., 5 minutos, 4 °C) para eliminar los restos de las células vegetales. Guardar alícuotas de 500 μ l del sobrenadante resultante, al que a partir de ahora denominaremos citosol de los nódulos.
- 4.- Centrifugar el resto del sobrenadante (8.000 r.p.m., 10 minutos, 4 °C).
- 6.- Resuspender el sedimento, al que a partir de ahora llamaremos bacteroides, en 1 ml/g de nódulos de tampón Pa. Lavar dos veces con el mismo tampón.
- 7.- Determinar actividad β -galactosidasa en alícuotas de 100 μ l del citosol y de los bacteroides como se indica en el apartado 2.2.5.

Tampón de extracción: Tris-HCl 50 mM; manitol 250 mM; pH 7,4

Tampón Pa: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ x 2 H₂O 100mM, pH 7,0

3.4.6. Preparación de muestras para microscopía

Nódulos de tamaño y localización parecidos, para asegurar un estado de desarrollo similar se trocearon con una cuchilla de acero inoxidable GEM para obtener muestras de aproximadamente 1 mm³, que se sumergieron en tampón cacodilato sódico 50 mM (pH 7,4) que contenía sacarosa 5 mM.

a.- Fijación y postfijación

Las muestras se fijaron en una mezcla de glutaraldehído 0,5% y formaldehído 1% en cacodilato sódico 50 mM (pH 7,4) con sacarosa 5 mM durante 2 horas a 4 °C, con dos periodos de desgasificación de 2 minutos, para favorecer la penetración del fijador en el tejido, tras los cuales se procedió a la renovación del mismo. Seguidamente se realizaron tres lavados de 1 hora en tampón cacodilato-sacarosa a 4 °C y se procedió

a la postfijación con tetróxido de osmio 1 % en tampón cacodilato-sacarosa durante 1 hora a 4 °C. A continuación se hicieron tres lavados de 5 minutos en el mismo tampón.

b.- Deshidratación

La deshidratación se realizó en series de concentración creciente de etanol en agua, según el siguiente protocolo:

- Etanol 30 %: 10 minutos a 4 °C
- Etanol 50 %: 10 minutos a 4 °C
- Etanol 70 %: 10 minutos a 4 °C
- Acetato de uranilo 1 % en etanol 70 %, toda la noche a 4 °C
- Etanol 90 %: 10 minutos a 4 °C
- Etanol 96 %: 30 minutos a 4 °C
- 1^{er} Etanol 100 %: 1 hora a 4 °C
- 2^o Etanol 100 %: 1 hora a 4 °C

c.- Infiltración progresiva en resina LR-White

El etanol se reemplazó gradualmente por resina LR White (LRW) mediante incubaciones sucesivas con soluciones de concentración creciente de resina en etanol y resina pura, según el siguiente protocolo:

- LRW:Etanol 100 % 1:3, 3 horas a 4 °C en cámara fría con agitación.
- LRW:Etanol 100 % 1:1, 24-48 horas a 4 °C.
- LRW:Etanol 100 % 3:1, 3 horas a 4 °C en cámara fría con agitación.
- LRW pura, 24-48 horas a 4 °C.
- LRW pura, 24-48 horas a 4 °C.
- Confección del bloque mediante polimerización de la resina, calentando a 50°C durante al menos 12 horas.

d.- Obtención de secciones histológicas

Las muestras se seccionaron en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S, (Leica, Vienna, Austria) equipado con cuchillas de diamante Diatome 45°. Los bloques de LR-White se sujetaron en la mordaza del aparato y se tallaron con una cuchilla de acero

inoxidable GEM hasta que el tejido quedó accesible. A continuación se realizaron secciones semifinas (1 μm) para su observación en microscopía óptica y ultrafinas (70 nm) para observaciones con microscopía electrónica.

e.- Microscopía óptica

Los secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina 1% (p/v) en borax 1% durante 10 minutos. La estructura de los nódulos se observó en un microscopio Axiophot (Zeiss, Jena, Alemania) con sistema fotográfico integrado.

f.- Microscopía electrónica de transmisión

Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de cobre o níquel con malla de 200 ventanas y se tiñeron con citrato de plomo (Reynolds, 1963). El contraste se efectuó colocando una gota de la solución de citrato de plomo sobre un papel parafilm en una placa de Petri con cera dental en el fondo. A dicha placa se le extrajo la humedad colocando perlititas de NaOH durante los 20 minutos previos a la introducción de las rejillas. Tras 20-30 minutos de contacto con la gota de solución de citrato de plomo, los cortes son enjuagados vigorosamente en tres baños de agua destilada previamente hervida y enfriada para eliminar el CO₂ disuelto.

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico STEM LEO 910 con una tensión de 80 kV dotado con una cámara digital Gatan Bioscan (mod-792) para la adquisición de imágenes.

3.4.7. Parámetros fisiológicos de las plantas de soja

Tras el tiempo de cultivo, las plantas se sacaron de las jarras Leonard, se lavaron las raíces para eliminar la vermiculita y se secaron con papel de filtro. Se contó el número de nódulos y se determinó el peso fresco y seco de los nódulos, así como el peso seco y el contenido en nitrógeno de cada planta. Para las dos últimas determinaciones, las plantas se secaron en una estufa de corriente forzada de aire a 60 °C durante 48 h. Posteriormente, las plantas se pesaron y se molieron en un molinillo eléctrico. Los valores obtenidos se analizaron de forma estadística con el programa Statgraphics plus.

3.4.8. Determinación del contenido en nitrógeno [N]

3.4.8.1. Proceso de mineralización por vía húmeda

Para la determinación del contenido en [N], las muestras se sometieron a un proceso de mineralización por vía húmeda de acuerdo con la técnica descrita por Lachica et al. (1965, 1973):

- 1.- Secar de nuevo las plantas molidas durante 8 h a 70 °C.
- 2.- Pesar 0,250 g de muestra y transferirla al tubo de digestión.
- 3.- Añadir 5 ml de H₂SO₄ concentrado (95%-98%).
- 4.- Colocar el tubo en el digestor previamente calentado a 100 °C y digerir durante 30 min.
- 5.- Sacar los tubos de digestión y subir la temperatura del digestor hasta 200 °C.
- 6.- Añadir a la muestra 1,5 ml de H₂O₂ (33%, p/v) y volver a colocar los tubos en el bloque digestor a 200 °C durante 15 minutos.
- 7.- Sacar los tubos del bloque y esperar a que se enfríen aproximadamente 10 min. A continuación añadir 1,5 ml de H₂O₂ (33%, p/v), colocar los tubos en el bloque y dejarlos 15 minutos.
- 8.- Sacar los tubos para comprobar si la muestra está incolora. En caso contrario repetir el procedimiento del punto 7 tantas veces como sea necesario hasta conseguirla.
- 9.- Colocar los tubos en el bloque durante 15 minutos, sin incluir ningún producto adicional para finalizar la digestión.
- 10.- Dejar enfriar la muestra y añadir agua bidestilada enrasando a 50 ml. Agitar manualmente la solución.

3.4.8.2. Determinación de N

El N se valoró utilizando el sistema Baethgen y Alleg (1989), que mide el contenido en N-NH₄⁺ en digeridos de suelo y plantas. El método se basa en la reacción colorimétrica que tiene lugar entre el NH₄⁺, el salicilato sódico y el cloro en presencia de nitroprusiato sódico. El protocolo de trabajo es el que se muestra a continuación:

- 1.- Preparar la siguiente mezcla, agitando cada vez que se añade un nuevo reactivo:
 - 0,25 ml de muestra
 - 0,25 ml de agua bidestilada

2,75 ml de solución tampón (Reactivo A)

2 ml de solución de salicilato (Reactivo B)

0,5 ml de solución de hipoclorito (Reactivo C)

2.- Dejar la mezcla en reposo durante 30 min. El color verde esmeralda que queremos medir se desarrolla entre los 12-40 min y es estable durante 120 minutos.

3.- Determinar la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular Beckman-25. Como referencia se construyó una curva patrón a partir de una solución con un contenido en N de 100 mg/l y se prepararon diluciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 mg/l.

Reactivo A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 4,45 g; $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 12,5 g; NaOH, 13,5 g; Enrasar a 250 ml con H_2O destilada.

Reactivo B: $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$, 37,5 g; $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,075 g. Enrasar a 250 ml con H_2O destilada. Conservar en un recipiente protegido de la luz.

Reactivo C: NaClO 5,25%, 6 ml. Enrasar a 100 ml con H_2O destilada.

3.5. Extracción y detección de autoinductores en *B. japonicum*

3.5.1. Preparación de extractos

3.5.1.1. Extracción de autoinductores de los sobrenadantes de cultivos bacterianos

a.- Cultivo de células

- 1.- Inocular 3 ml de PSY con la cepa de *B. japonicum* de la que se quiera comprobar su capacidad de producir autoinductores.
- 2.- Incubar durante 3-4 días en agitación (120 r.p.m) a 30 °C.
- 3.- Inocular (dilución 1:10) 25 ml de PSY y cultivar durante 3-4 días.
- 4.- Inocular (dilución 1:50) 1.250 ml de PSY y cultivar durante 8 días.

b.- Preparación de extractos

- 1.-Adicionar al cultivo NaCl (240 gr/l) y agitar hasta que se disuelva.
- 2.- Adicionar acetato de etilo (1:1 v/v) previamente tratado con 10 g/l de KOH y agitar durante 12 h.
- 3.- Decantar y separar la fase orgánica.
- 4.- Secar la fase orgánica mediante rotaevaporación a 40 °C
- 5.- En caso necesario, tratar con Na₂SO₄ anhidro (Wilson et al. 1997) para eliminar los restos de agua.
- 5.- Conservar la muestra a -20 °C.
- 6.- Disolver con 100 µl de acetato de etilo para su uso. Se define 1 µl equivalente como el volumen correspondiente a 12,5 ml del extracto obtenido de los sobrenadantes bacterianos.

3.5.1.2. Extracción de autoinductores de nódulos de soja

a.- Obtención de citosol de los nódulos y del de los bacteroides

Para la obtención de citosol de los nódulos y del de los bacteroides se ha seguido la metodología indicada en el apartado 2.4.5., excepto por el empleo exclusivo de tampón fosfato magnésico. Se utilizaron 12 g de nódulos que se homogeneizaron con 48 ml de tampón.

Una vez obtenidos, los bacteroides se lavaron dos veces y se rompieron mediante diferencia de presión (1.000 psi) utilizando una prensa de French (Aminco®). Finalmente, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación (8.000 r.p.m a 4 °C). A la fracción obtenida la denominaremos, de hora en adelante, citosol de los bacteroides, que se guardó a -20 °C hasta su empleo.

Tampón fosfato magnésico: MgCl₂ (2,5 mM); KH₂PO₄ (50 mM); pH 6,8

El citosol de los nódulos y el de los bacteroides se trataron con acetato de etilo conforme se describe en el apartado 2.5.1.1.

3.5.2. Detección de autoinductores

La detección de autoinductores se ha llevado a cabo mediante los bioensayos que utilizan *C. violaceum* CV026 (McClellan et al. 1997) y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 (Cha et al. 1998) como biomarcadores.

3.5.2.1. Bioensayos con *C. violaceum* CV026

C. violaceum CV026 es una cepa mutada en el gen *cviI* mediante inserción del interposón Tn5, incapaz de producir la sintasa CviI que interviene en la producción de 3-hexanoil homoserina lactona (C₆-HSL). Este compuesto, a su vez, induce la producción del pigmento denominado violaceína, cuya producción se restaura mediante incubación con homoserina lactona exógena.

Se pueden realizar dos tipos de ensayo con *C. violaceum* CV026:

C. violaceum CV026 revela la presencia de diferentes tipos de moléculas autoinductoras en función de que el ensayo realizado sea directo o reverso. El ensayo directo, cuyo resultado positivo se corresponde con la formación de un halo violeta sobre césped blanco-amarillento de CV026, típicamente detecta homoserín lactonas de cadena acílica menor de 8 átomos de carbono. El ensayo reverso, que es positivo cuando aparece un halo blanco con crecimiento bacteriano pero sin producción de violaceína, sobre fondo violeta, suele aplicarse para detectar homoserín lactonas de cadena acílica mayor de 8 átomos de carbono. El resultado positivo del ensayo reverso implica la presencia de moléculas autoinductoras con actividad homoserina lactona que antagoniza con la AHL comercial añadida al medio de cultivo. Sin embargo ninguno de estos ensayos sirve para detectar 3-hidroxi-derivados y es muy poco sensible a los 3-oxo-derivados y alkanoil-HSLs de cadena larga. A diferencia de otros biosensores, detecta muy bien BHL (*N*-butiril homoserina lactona) y es muy sensible a alkanoil-HSLs de cadena corta y media.

Para cualquiera de los ensayos que se describen a continuación, es necesario preparar previamente una suspensión moderadamente turbia de *C. violaceum* CV026 en medio líquido LB. Para ello, se adicionan, aproximadamente, un asa o dos de *C. violaceum* CV026 crecida en placa fresca de LB a 1 ml de medio líquido.

a.- Ensayo directo

- 1.- Preparar una suspensión moderadamente turbia de *C. violaceum* CV026 en medio líquido LB.
- 2.- Mojar un bastoncillo estéril en la solución de *C. violaceum* CV026 y aplicarlo sobre placas Petri con medio LB, procurando una inoculación en césped. Dejar secar.
- 3.- Adicionar a la placa 1-5 μ l de la muestra a ensayar. El volumen de muestra varía según la actividad de la misma. Dejar secar.
- 5.- Incubar a 30°C durante 24-72 h.

b.- Ensayo reverso

- 1.- Adicionar muestra* a ensayar sobre placas Petri conteniendo medio LB y dejar secar.
- 2.- Sobre la placa Petri, adicionar 5 ml de medio LB semisólido (0.3% de agar) inoculado con 100 µl de una suspensión moderadamente turbia de *C. violaceum* CV026 y 2,5 µl de N-(β-ketocaproyl)-L-homoserina lactona (OHHL, 10 mM en acetonitrilo).
- 5.- Agitar en vórtex y verter la mezcla sobre la placa de medio y dejar secar.
- 6.- Incubar a 30 °C durante 24-72 h.

***Muestra:** Puede ser citosol y sobrenadantes de bacteroides, extractos orgánicos, productos de purificación mediante cromatografía, HPLC, etc. Se utilizaron 200 µl para muestras de citosol y sobrenadantes de bacteroides, y 5 µl para extractos orgánicos. Para volúmenes superiores a 25 µl, la muestra se depositó dentro de cilindros de acero inoxidable esterilizados con alcohol.

3.5.2.2. Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4

A. tumefaciens NT1-pZLR4 es una cepa que carece del plásmido Ti y contiene el plásmido pZLR4 en el que se ha clonado el gen *traR* y una fusión *traG::lacZ*. Esta cepa es incapaz de producir su propio autoinductor, y la fusión *lacZ* sólo se expresa en presencia de moléculas autoinductoras exógenas.

El protocolo de trabajo utilizado se detalla a continuación:

- 1.- Cultivar *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 en 5 ml de TY líquido durante 12 horas.
- 2.- Preparar placas de medio AB suplementadas con 40 µg/ml de Xgal.
- 3.- Sembrar las placas utilizando un bastoncillo estéril empapado en un cultivo líquido de *A. tumefaciens* NTL4-pZLR4. Secar las placas.
- 4.- Adicionar a las placas las muestras* que se quieran ensayar.
- 5.- Incubar 1-2 días a 30 °C.

XGal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (20 mg/ml en dimetilformamida).

***Muestra:** Puede ser citosol y sobrenadantes de bacteroides, extractos orgánicos, productos de purificación mediante cromatografía, HPLC, etc. Se utilizaron 5 µl para muestras de citosol y sobrenadantes de bacteroides, y 5 µl para extractos orgánicos.

3.5.3. Separación de autoinductores mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography) se empleó para separar los diferentes compuestos que podían contener los extractos con actividad autoinductora, lo que se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Con un tubo capilar aplicar 125 µl equivalentes* (10 µl de extracto) sobre una placa de sílica gel RP C₁₈ (Merck).
2. Introducir la placa en un tanque de cromatografía con el volumen adecuado de una mezcla de metanol:agua (60:40 v/v) y sellarlo con parafina.
3. Permitir el desarrollo de la cromatografía hasta que el frente quede a 2 cm de la parte superior de la placa (unas 2,5 h en el sistema empleado)
4. Sacar la placa del tanque y dejar secar.

*Se define que 1 µl de muestra es equivalente a 12,5 ml del sobrenadante bacteriano.

3.5.4. Detección de autoinductores en placas TLC

Tras la separación de los autoinductores mediante TLC, su detección se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Cha et al. (1998), con las siguientes modificaciones:

- 1.- Cultivar *C. violaceum* CV026 o *A. tumefaciens* NTL4-pZLR4 en medio LB (sin antibiótico) o AB (con Gm), respectivamente, la noche anterior, a 30 °C
- 2.- Inocular 25 ml de medio LB o AB con 250 µl de los cultivos previos de *C. violaceum* CV026 o *A. tumefaciens* NTL4-pZLR4 e incubar
- 3.- Incubar las células a 30 °C durante 4-6 h si se trata de *C. violaceum* CV026. Para *A. tumefaciens* NTL4-pZLR4 incubar durante 6-8 horas.

4.- Adicionar:

Al cultivo de *C. violaceum* CV026:

- 25 ml de LB semisólido 0,75% de agar
- 25 µl de OHHL (10 mM)

Al cultivo de *A. tumefaciens* NTL4-pZLR4:

- 25 ml de AB semisólido 0,75% de agar

- 300 µl de XGal (20 mg/ml)

5.- Verter sobre la placa de TLC. Incubar a 30 °C durante 12 horas.

OHHL: N-(β-ketocaproyl)-L-homoserina lactona (10 mM en acetonitrilo).

XGal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (20 mg/ml en dimetilformamida).

3.6. Purificación de autoinductores

3.6.1. Preparación del extracto

Se emplearon cultivos bacterianos de 1.250 ml en lotes sucesivos de 7.5 l hasta completar un total de 120 l. El extracto obtenido a partir de cada lote se conservó en viales independientes que se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez comprobada la actividad autoinductora en cada lote, se mezclaron, secaron mediante rotaevaporación y se guardaron hasta la posterior purificación de compuestos activos.

3.6.2. Separación de fracciones

3.6.2.1. Cromatografía de líquidos en columna (LSC, liquid-solid chromatography)

La purificación se inició con la cromatografía líquido-sólido (LSC) para separar fracciones mediante adsorción selectiva de los constituyentes de la muestra. La fase estacionaria estaba constituida por gel de sílice, de 0,04-0,06 mm de diámetro, inmovilizado dentro de una columna de cromatografía de 3 cm de diámetro. Como fase móvil se utilizaron distintas mezclas de disolventes orgánicos. La separación tuvo lugar en dos fases sucesivas.

a.- Primera separación por LSC

- 1.- Humectación del gel de sílice en la columna mediante adición de hexano.
- 2.- Disolver la muestra en la menor cantidad posible de acetato de etilo (aproximadamente 2 ml) y aplicarla en la parte superior de la columna.
- 3.- Eluir el extracto en gradiente de polaridad creciente recogiendo el eluido en tubos de 30 ml. Se empleó la siguiente secuencia de disolventes:

- 1° 200 ml hexano
- 2° 100 ml hexano-éter (9:1)
- 3° 100 ml hexano-éter (8:2)
- 4° 100 ml hexano-éter (7:3)
- 5° 100 ml hexano-éter (1:1)
- 6° 200 ml hexano-éter (3:7)

- 7°) 200 ml éter
- 8°) 200 ml éter-acetato de etilo (8:2)
- 9°) 200 ml éter-acetato de etilo (1:1)
- 10°) 200 ml éter-acetato de etilo (2:8)
- 11°) 100 ml acetato de etilo
- 12°) 200 ml metanol

4.- Aplicar, mediante tubo capilar de vidrio, una mínima cantidad de cada una de las muestras sobre cromatoplasas Alugram[®] Sil G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel) y eluir en tanque de elución con una fase móvil hexano:éter (3:7, v/v).

5.- Detección de compuestos mediante observación de las cromatoplasas con luz UV.

6.- Reunión de las fracciones en las que se detectaron compuestos similares.

7.- Detección de actividad autoinductora mediante *C. violaceum* CV026 en cada una de las reuniones.

b.- Segunda separación por LSC

Las fracciones E, F y G se mezclaron y se sometieron a una nueva separación por LSC:

1.- Elución en gradiente de polaridad creciente con la siguiente fase móvil:

- | | | |
|-------|--------------------------|--------------------|
| - 1°) | 600 ml hexano-éter (1:9) | Tubos del 1 al 22 |
| - 2°) | 600 ml acetato de etilo | Tubos del 22 al 40 |
| - 3°) | metanol | Matraz de lavado |

2.- Aplicar, mediante tubo capilar de vidrio, una mínima cantidad de cada una de las muestras sobre cromatoplasas Alugram[®] Sil G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel) y eluir en tanque de elución con una fase móvil hexano:éter (1:9, v/v).

3.- Detección de compuestos mediante observación de las cromatoplasas con luz UV.

4.- Reunión de las fracciones en las que se detectaron compuestos similares. Las reuniones que se realizaron, y sus respectivos pesos secos, fueron:

- Reunión H: Tubos 3-5 (74 mg)
- Reunión I: Tubos 6-12 (24 mg)

- Reunión J: Tubos 13-25 (20 mg)
- Reunión K: Tubos 26-40 (55 mg)

5.- Detección de actividad autoinductora en cada una de las reuniones mediante *C. violaceum* CV026.

3.6.2.2. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

3.6.2.2.1 Determinación del máximo de absorción

Previo a la purificación por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) se determinó la longitud de onda (λ) correspondiente al valor máximo de absorción de la muestra. Para ello, se preparó una disolución de 25 mg en 2 ml de acetonitrilo adicionada de 25 gotas de cloruro de metileno. Como blanco se utilizó una mezcla de ambos disolventes. La muestra se colocó en una cubeta de cuarzo y se determinó el valor de absorción para valores de λ entre 200 y 750 nm, en intervalos de 10 unidades. Para definir el valor máximo, se realizó un segundo espectro a intervalos de 1 unidad. En ambos caso se utilizó un espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia Biotech).

3.6.2.2.2. HPLC

La purificación de los compuestos obtenidos después de la cromatografía sólido-líquido se llevó a cabo mediante HPLC. Se utilizó un cromatógrafo (Waters, modelo Breeze) equipado con un detector de luz UV programado para emitir a λ s 251 nm y 200 nm.

a.- HPLC de las fracciones E, F, G y H

Para comprobar el desarrollo de los cromatogramas se empleó una columna analítica (Waters Symmetry C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm) de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1.- Flujo de 1 ml/minuto
- 2.- Separación en gradiente acetonitrilo:agua (%) durante 30 minutos.
 - Tiempo 0: acetonitrilo:agua (0:100)
 - Tiempo 30 minutos: acetonitrilo:agua (100:0)

La separación de los componentes de la reunión H, cuyo se llevó a cabo empleando una columna semipreparativa (Kromasil 100, C8 5 μm , 25 x 1.0 mm) siguiendo el protocolo anterior excepto que el flujo fue de 3 ml/minuto y el tiempo de separación de 60 minutos. Las fracciones recogidas corresponden a cada uno de los picos detectados en el cromatograma, por lo que su volumen es variable. La detección de actividad autoinductora en cada una de las fracciones resultantes se llevó a cabo mediante *C. violaceum* CV026.

b.- HPLC de la fracción K

La cromatografía analítica de la reunión K se efectuó como se indica a continuación:

1.- Flujo de 1 ml/minuto

2.- Separación en gradiente acetonitrilo:agua (%) durante 30 minutos.

Tiempo 0: acetonitrilo:agua (0:50)

Tiempo 30 minutos: acetonitrilo:agua (50:0)

La separación de los componentes de las reunión K se llevó a cabo de la manera descrita en el caso de la reunión H. Igualmente, la detección de actividad autoinductora en el eluato se realizó mediante *C. violaceum* CV026.

3.6.3. Estructura de los compuestos con actividad autoinductora

La elucidación de las estructuras de los compuestos purificados mediante LSC y HPLC se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protones, Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, Resonancia Magnética Nuclear de Correlación Protón-Carbono, Espectrometría de Masas de Baja y Alta Resolución y, en algunos casos, Difracción de Rayos X.

3.6.3.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protones ($^1\text{HRMN}$), de Carbonos ($^{13}\text{CRMN}$) y de Correlación Protón-Carbono (HMQC).

Los espectros monodimensionales de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, y bidimensionales de correlación protón-carbono (HMQC) se realizaron en la Unidad de Resonancia

Magnética Nuclear del Servicio de Determinación de Estructuras de la Universidad de Granada. Se utilizó un espectrómetro BRUKER ARX de 400 MHz. Los espectros se obtuvieron a partir de las muestras disueltas en aproximadamente 2 ml de metanol deuterado, a excepción del correspondiente a la reunión K cuya disolución se realizó en cloroformo deuterado.

3.6.3.2 Espectrometría de Masas (MS) de Baja y Alta Resolución

El espectro de masas (Mass Spectrometry, MS) de baja resolución de la reunión K se realizó en el Instituto del Agua. Se empleó un espectrómetro equipado con una columna HP-5. La muestra se disolvió en metanol a una concentración de 10 mg/ml. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes:

- Gradiente de GC:
 - Temperatura del inyector: 300 °C
 - Temperatura inicial del horno: 10 0°C
 - Tiempo de espera: 3 minutos.
 - Temperatura final del horno: 300 °C
 - Rampa de temperatura: 20 °C/min
 - Tiempo de espera: 2-15 min para un tiempo total de 15 minutos.

La masa de la fracción activa que se purificó por HPLC a partir de la reunión H se determinó mediante espectrometría de masas de baja resolución en un espectrómetro KRATOS MS50. La ionización se realizó mediante impacto electrónico, empleando una energía de 70 eV y una temperatura en la fuente de ionización de 180°C.

El dato obtenido se confirmó por espectrometría de masas de alta resolución (High Resonant Mass Spectrometry, HRMS) en un espectrómetro THERMOQUEST MAT 95XL, utilizando la técnica de impacto electrónico (EI) y la espectrometría de masas por bombardeo atómico rápido (FAB) en la que se emplearon matrices de tioglicerol dopadas en un 1% con NaI.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de los genes *luxRI* de *B. japonicum* USDA110

4.1.1. Identificación, clonación y secuenciación de los marcos abiertos de lectura *blr1062* y *blr1063*

En el genoma completo de *B. japonicum* USDA110 (Kaneko et al. 2002) se localizan dos marcos abiertos de lectura (ORF), *blr1062* y *blr1063* (Anexo 1) con homología a otros genes de la familia *luxRI* relacionados con procesos regulados por QS. La amplificación mediante PCR de *blr1062* y *blr1063* originó un fragmento *EcoRI/PstI* de 2,1 kb que se clonó en pGEM-T para obtener el plásmido pBG0801 (Figura 4.1A).

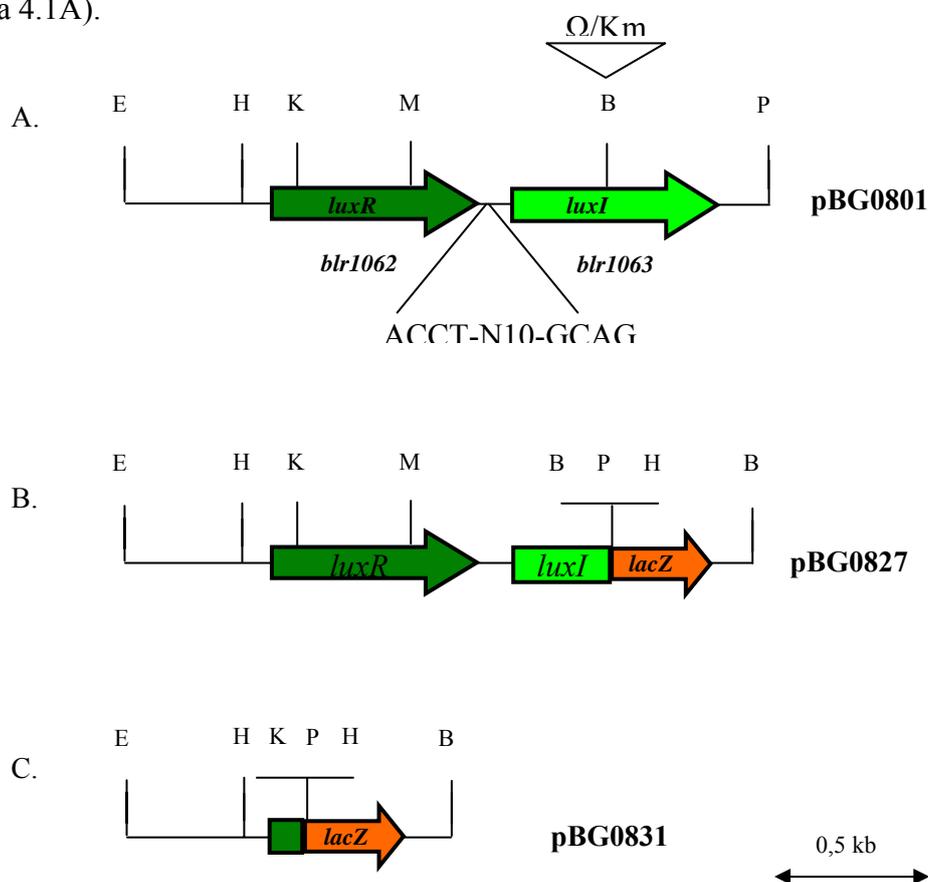


Figura 4.1. Genes *luxRI* de *B. japonicum* USDA110. A. Mapa físico y genético de la región del cromosoma de *B. japonicum* USDA110 donde se localizan los genes *luxRI*. Las flechas indican la localización relativa y el sentido de la transcripción de cada gen. El triángulo señala el sitio de restricción *BamHI* donde se realizó la inserción del gen de resistencia a la kanamicina (fragmento Ω). La secuencia ACCT-N10-GCAG, conocida como caja *lux*, se sitúa en la región intergénica. B. Fusión transcripcional P_{luxI} -*lacZ*. C. Fusión transcripcional P_{luxR} -*lacZ*. B, *BamHI*; H, *HindIII*; M, *MluNI*; P, *PstI*.

4.1.1.1. Características del ORF *blr1062*

El análisis de la secuencia del ADN clonado reveló que *blr1062* está formado por 730 pares de bases con un contenido en G + C del 63%. En sentido 5'-3', el codón ATG representa el posible sitio de inicio de la transcripción, y la secuencia AGGAAA, localizada en dirección 3'-5' a -13 pares de bases del ATG, la probable secuencia Shine-Dalgarno de unión al ribosoma. El codón de terminación es TAA. El ORF *blr1062* está formado por 242 aminoácidos, con un tamaño molecular estimado de 27.215 Da. Su secuencia aminoacídica presenta entre el 27% y el 68% de identidad con proteínas reguladoras de la transcripción de la familia LuxR (Tabla 1). En el extremo N-terminal del producto codificado por *blr1062*, del aminoácido 25 al aminoácido 157, se localiza una secuencia característica de dominios de unión a moléculas autoinducidas (Hanzelka y Greenberg, 1995), y en el C-terminal, entre los aminoácidos 179 y 234, se localiza un dominio de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice (H-T-H, Choi y Greenberg, 1991). Estos dominios conservados presentaron respectivamente un 30% y un 47,3% de identidad con sus correspondientes secuencias consenso (Anexo 1).

Organismo	Identidad (%)	Número de Acceso
<i>R. palustris</i> BisA53	68	ZP_00811924
<i>R. leguminosarum</i>	34, 28, 27	AAA26360, AAF89989, CAD20930
<i>P. aeruginosa</i>	28	BAA06489
<i>V. fischeri</i>	27	CAA68561
<i>C. violaceum</i>	27	AAP32919
<i>R. etli</i>	27	AAL59595

Tabla 4.1. Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína LuxR de *B. japonicum* USDA110 y la de las proteínas LuxR de otras bacterias. LuxR de *Rhodopseudomonas palustris* BisA53 (Copeland et al. 2005), RhiR (Cubo et al. 1992), CinR (Lithgow et al. 2000) y RaiR (Wisniewski-Dye et al. 2002) de *R. leguminosarum*, LasR de *Pseudomonas aeruginosa* (Fukushima et al. 1994), LuxR de *Vibrio fischeri* (Engebrecht et al. 1987; Devine et al. 1988), CviR de *Chromobacterium violaceum* (Winson et al. 2003), y CinR de *R. etli* (Daniels et al. 2002).

Situada a -126 pares de bases de codón ATG de inicio de *blr1062* se localiza la secuencia TGT-N10-ACA que presenta un 100% de identidad con la secuencia consenso descrita como sitio de unión de la proteína NifA (Gottfert 2001).

4.1.1.2. Características de *blr1063*

La secuencia de *blr1063* contiene 672 pares de bases con un contenido en G + C del 65%. En sentido 5'-3', el codón ATG puede ser el posible sitio de inicio de la transcripción, y la secuencia A-N2-GAGG, localizada, en dirección 3'-5', a -11 pares de bases del codón ATG, representa la probable secuencia Shine-Dalgarno de unión al ribosoma. El codón de terminación de la transcripción es el triplete TGA. El marco abierto de lectura *blr1063* codifica una homoserina lactona sintasa de la familia LuxI compuesta por 223 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 25.383 Da. El porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica del producto de *blr1063* osciló entre el 29% y el 75% con el de otras proteínas sintasas de la familia LuxI (Tabla 2). Entre los aminoácidos 5 y 199 de la secuencia de la proteína codificada por *blr1063* se localiza un dominio implicado en la síntesis de autoinductores, cuyo porcentaje de identidad con la secuencia consenso de la familia LasI es del 36%(Anexo 1).

Organismo	Identidad (%)	Número de Acceso
<i>R. palustris</i> BisA53	75	ZP_00811925
<i>R. leguminosarum</i>	30,26	AAF89990, CAD20929
<i>P. aeruginosa</i>	25	NP_250123
<i>R. etli</i>	29	AAL59596

Tabla 4.2. Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína LuxI de *B. japonicum* USDA110 y la de las proteínas LuxI de otras bacterias. LuxI de *Rhodopseudomonas palustris* BisA53 (Copeland et al. 2005), CinI (Lithgow et al. 2000) y RaiI (Wisniewski-Dye et al. 2002) de *R. leguminosarum*, LasI de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Stover et al. 2000), y CinI de *R. etli* (Daniels et al. 2002).

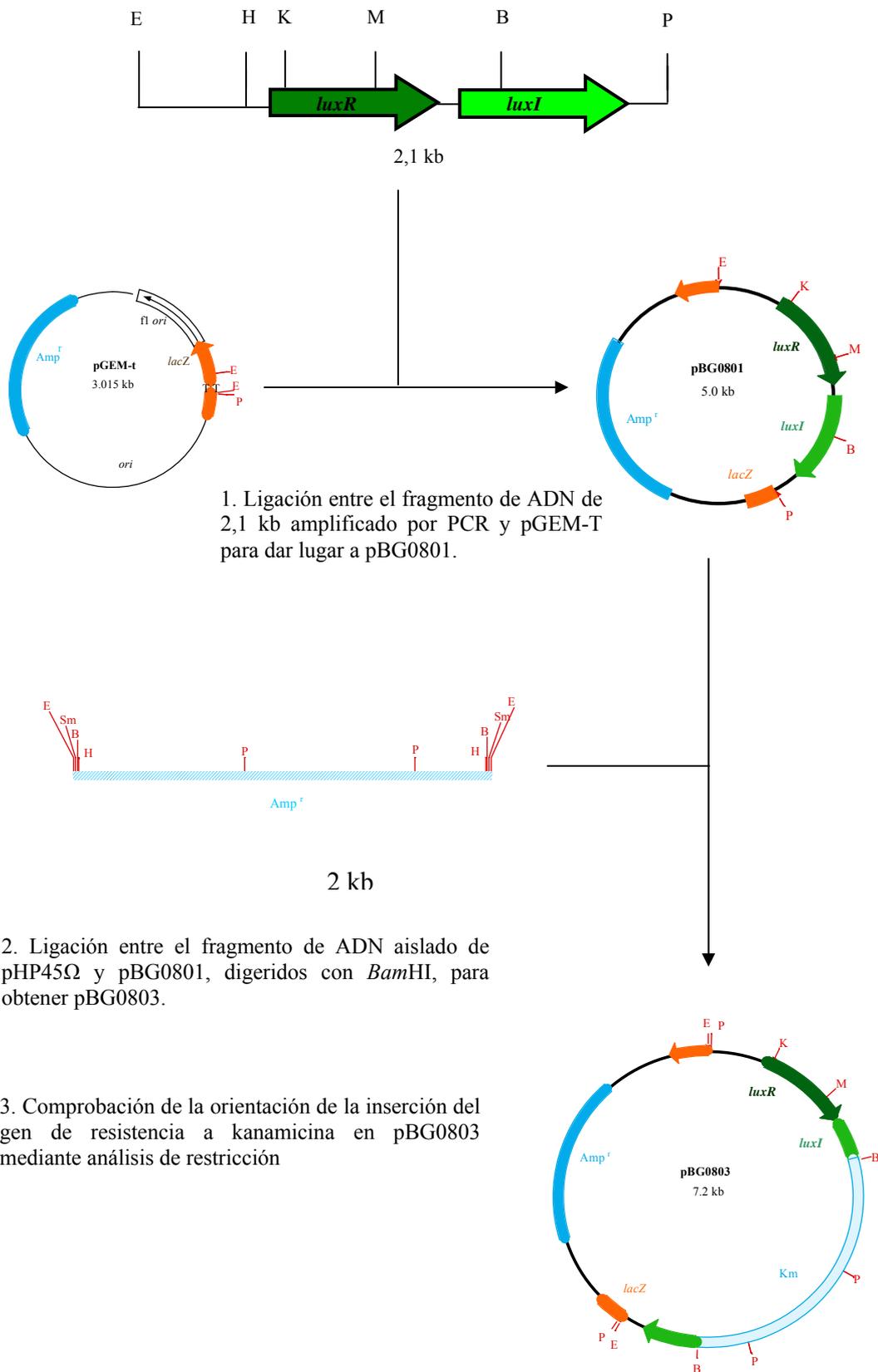
Entre *blr1062* y *blr1063* existe una región intergénica de 71 pares de bases donde se localiza la secuencia ACCT-N10-GCAG (Anexo 1, Figura 4.1A), que presenta un 100% de identidad con la secuencia consenso de la denominada caja *lux*, descrita como sitio de unión de las proteínas reguladoras de la familia LuxR (Egland y Greenberg, 1999; Pessi y Haas, 2000).

A - 99 y a -129 pares de bases del sitio del ATG de *blr1063*, las secuencias GAT-N13-ATC y GG-N10-GC presentan un 100 % de identidad con las secuencias consenso descritas como sitios de unión de las proteínas Fur (Friedman y O'Brian, 2003) y RpoN (Thompson et al. 2003; Heurlier et al. 2003), respectivamente.

Dada la identidad de los ORFs *blr1062* y *blr1063* de *B. japonicum* USDA110 con genes de la familia *luxRI* cuyos productos son proteínas implicadas en la regulación por QS, se les ha denominado genes *luxR* y *luxI*, respectivamente.

4.1.1.3. Obtención de una cepa mutante en *luxI*

Para obtener una cepa mutante en el gen *luxI*, el fragmento *Bam*HI de 2 kb, que contiene el gen de resistencia a la kanamicina (interposón Ω) del plásmido pHP45 Ω , se insertó mediante mutagénesis dirigida en el gen *luxI* previamente clonado en pGEM-T. La correcta dirección de inserción del interposón Ω se comprobó mediante análisis de restricción. Posteriormente, el fragmento *Eco*RI/*Pst*I de 2,1 kb con el interposón Ω se clonó en el plásmido pSUP202 para dar lugar al plásmido pBG0805, que se transfirió mediante conjugación a *B. japonicum* USDA110 utilizando *E. coli* S17.1 como cepa donadora. En una primera ronda de selección se eligieron transconjugantes resistentes a kanamicina y, en una segunda ronda, se seleccionaron aquellas que eran sensibles a tetraciclina para asegurar la ocurrencia de doble recombinación. Finalmente se seleccionó una cepa mutada, a la que se ha denominado *B. japonicum* 0852, que se ha utilizado en este estudio. La estrategia para la obtención de la mutante 0852 se indica en la Figura 4.2.



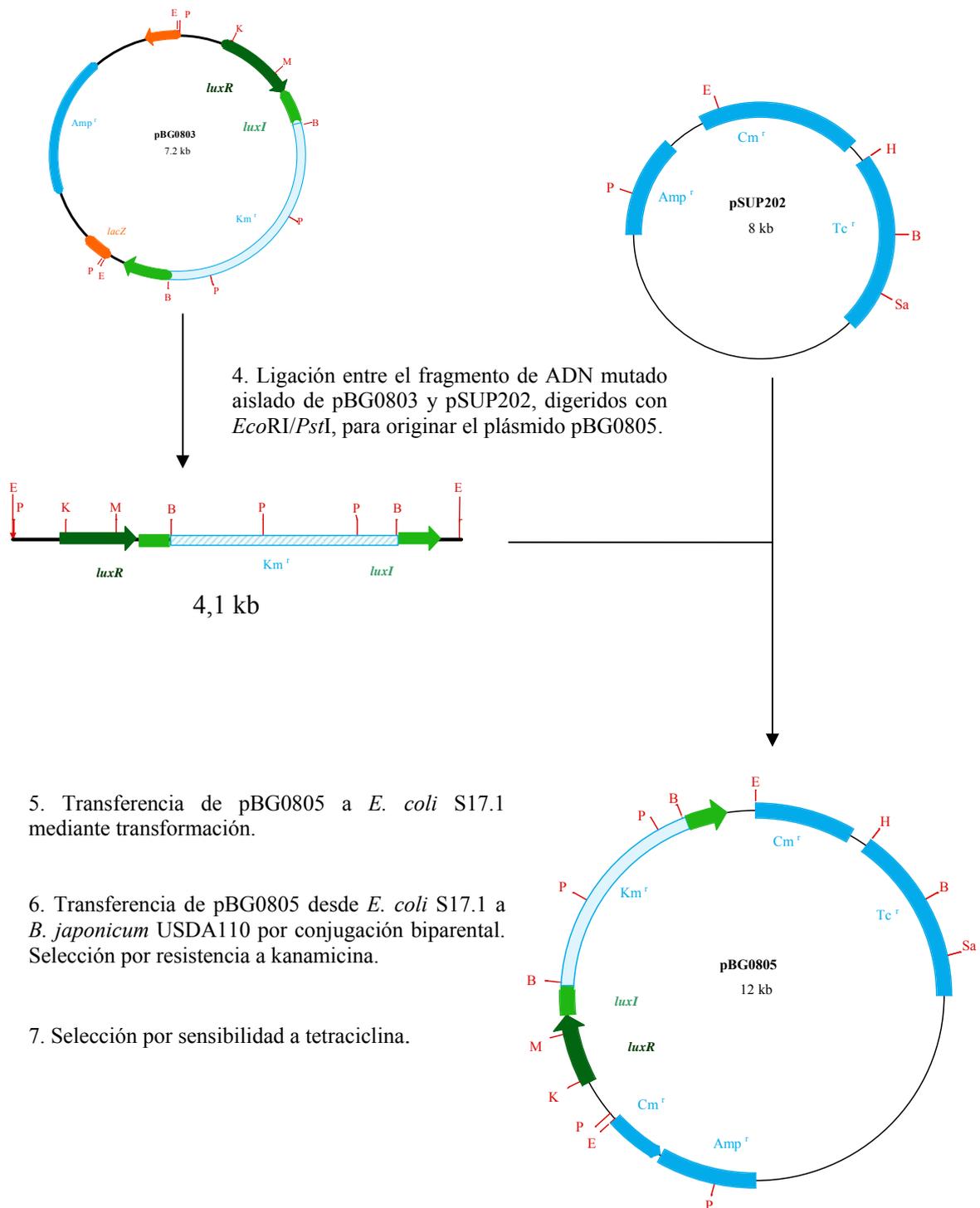


Figura 4.2. Estrategia para la obtención de *B. japonicum* 0852. Se muestra la construcción del plásmido suicida pBG0805 a partir de los plásmidos pBG0801 y pBG0803. Posteriormente, pBG0805 se transfirió, por cruce biparental a *B. japonicum* USDA110. E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; M, *MluNI*; P, *PstI*; Sa, *SaII*; Sm, *SmaI*.

Para comprobar la inserción del fragmento Ω en *luxI*, el ADN genómico de la mutante seleccionada se sometió a restricción con *Hind*III y se utilizó como molde para hibridar, por una parte, con una sonda preparada a partir del interposón Ω y, por otra, con una sonda que contenía los genes *luxRI* clonados en pGEM-T. Cuando se empleó la primera sonda, se detectó una única señal de hibridación de 2 kb en el ADN de la cepa 0852. En el segundo caso, mientras que se encontraron dos señales de hibridación de 22,5 kb y 6,4 kb en el ADN de la cepa parental, en el ADN de la cepa mutante se encontraron tres señales de hibridación con tamaños relativos correspondientes a 23,3 kb, 6,4 kb y 1,2 kb (Figura 4.3).

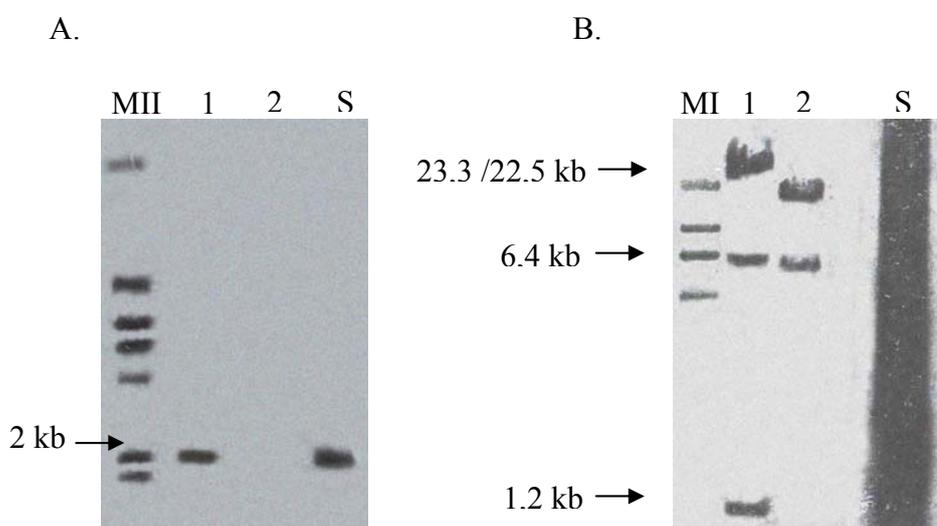


Figura 4.3. Detección de señales de hibridación en *B. japonicum*. Se empleó ADN genómico de *B. japonicum* USDA110 y 0852 digerido con *Bam*HI (panel A) y con *Hind*III (panel B). Como sondas de hibridación se utilizaron, de manera independiente, ADN del interposón Ω y ADN que contenía los genes *luxRI*. Carriles: MII y MIII, marcadores de tamaño molecular; 1, ADN genómico de USDA110; 2, ADN genómico de 0852; S, ADN del interposón Ω (Figura 4.3A) y de los genes *luxRI* (Figura 4.3B). Las flechas indican, en kb, el tamaño de las señales de hibridación. MII, genoma del fago λ digerido con *Hind*III. MIII, genoma el fago λ digerido con *Hind*III-*Eco*RI. MII y MIII están marcados con digoxigenina.

4.1.1.4. Complementación de la mutante *luxI*

El genotipo silvestre de la cepa 0852 se restauró mediante integración en el cromosoma de una copia completa del gen *luxI*. Para ello, la clonación del fragmento *KpnI/PstI* de 1,7 kb del plásmido pBG0801 en pUC18*NotI*, digerido con las mismas enzimas, dió lugar al plásmido pBG0807. Posteriormente, el mismo fragmento de ADN se aisló de pBG0807 mediante digestión con *NotI/PstI* y se clonó en pSUP202*polI*, dando origen al plásmido pBG0812. Finalmente, pBG0812 se transfirió por cruce biparental a *B. japonicum* 0852. En una primera ronda de selección se eligieron transconjugantes resistentes a la tetraciclina y, en una segunda ronda, se seleccionaron aquellas que eran sensibles a gentamicina para asegurar la ocurrencia de cointegración en el cromosoma. Se seleccionó una cepa complementada, a la que se ha denominado *B. japonicum* 0853, que se ha utilizado en este estudio. La estrategia de obtención de dicha mutante se indica en la Figura 4.4.

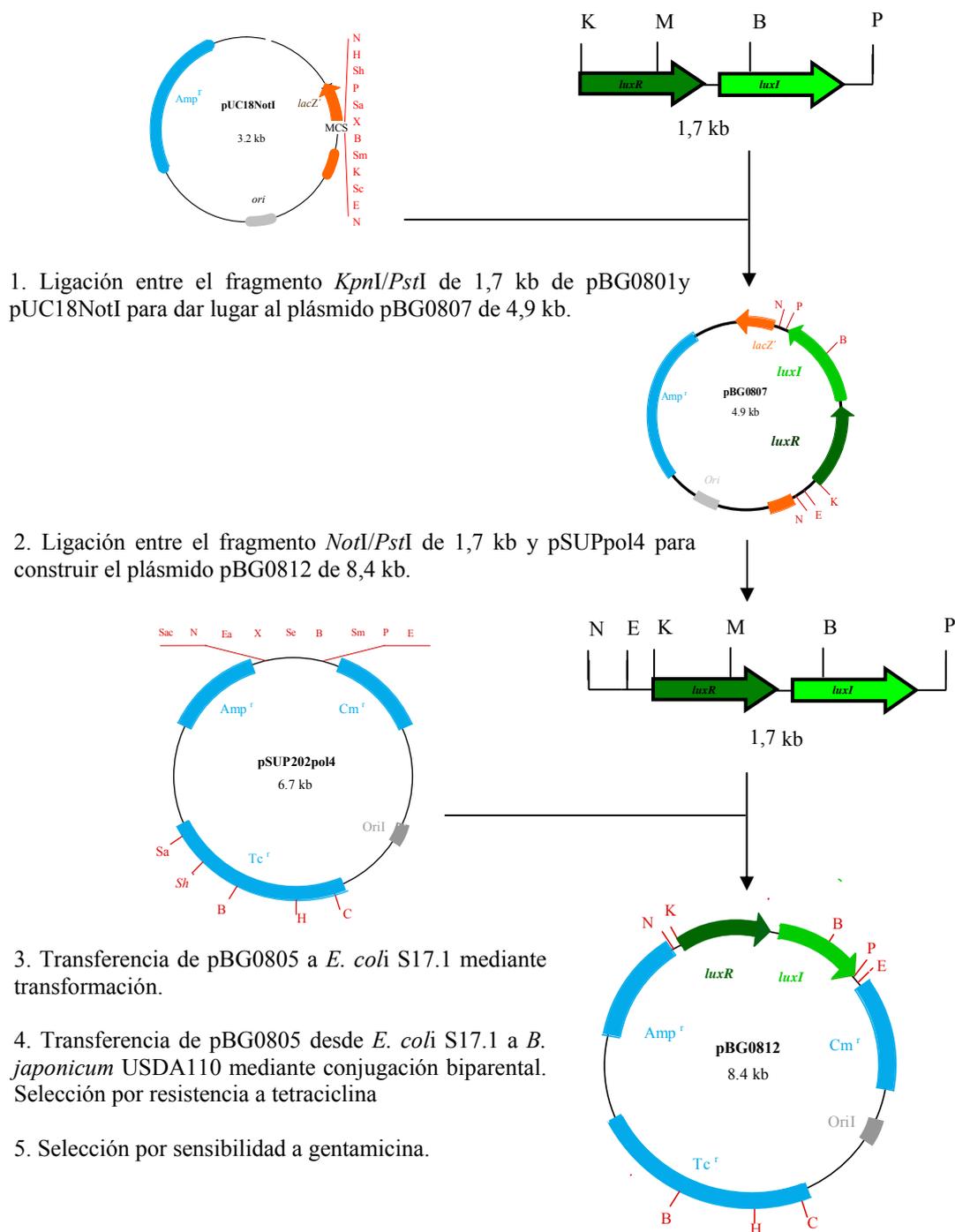


Figura 4.4. Estrategia para la complementación de *B. japonicum* 0852. Se muestra la construcción del plásmido pBG0812, que se transfirió, por cruce biparental, a *B. japonicum* USDA110. E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; M, *MluNI*; P, *PstI*; Sa, *Sall*; Sm, *SmaI*; N, *NotI*; Sh, *SphI*; X, *XbaI*; Sc, *SacI*; C, *ClaI*; Sac, *SacII*; Ea, *EagI*; Se, *SpeI*.

La integración de pBG0812 en el cromosoma se comprobó mediante hibridación del ADN genómico de las cepas 0852 y su derivada complementada empleando *luxRI* como sonda de hibridación. Mientras que en el ADN genómico de 0852 digerido con *ClaI* se encontró una única señal de 10,8 kb, en la cepa complementada se observaron dos señales de hibridación con tamaños relativos correspondientes a 10,8 kb y 6,3 kb, indicativo de la correcta estructura genómica de las cepas 0852 y 0853 (Figura 4.5).

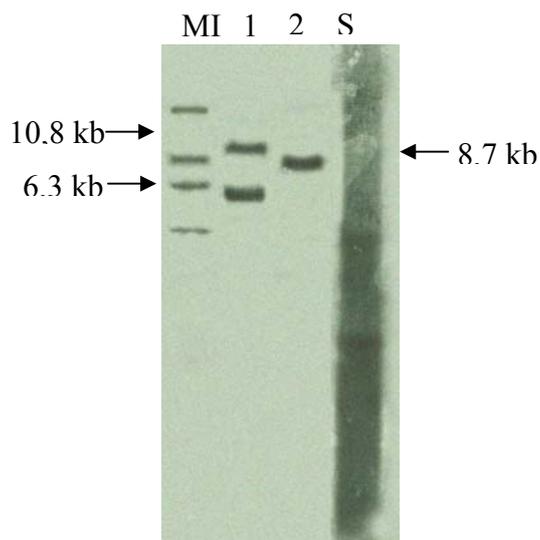


Figura 4.5. Detección de señales de hibridación en *B. japonicum* 0853. Se empleó ADN genómico de *B. japonicum* 0852 y 0853 digerido con *ClaI*. Como sonda de hibridación se utilizó ADN que contenía los genes *luxRI*. Carriles: MII, marcador de tamaño molecular marcado con digoxigenina; 1, ADN genómico de 0852; 2, ADN genómico de 0853; S, ADN de los genes *luxRI*. Las flechas indican, en kb, el tamaño de las señales de hibridación. MII, genoma del fago λ digerido con *HindIII* y tratado con digoxigenina.

4.1.1.5. Regulación de la expresión de los genes *luxRI*

4.1.1.5.1. Construcción de fusiones transcripcionales $P_{luxI-lacZ}$ y $P_{luxR-lacZ}$

Para estudiar la expresión de *luxRI* se construyeron fusiones transcripcionales de los genes *luxI* y *luxR* con el gen *lacZ* que, posteriormente, se integraron en el cromosoma de diferentes cepas de *B. japonicum*.

Para construir la fusión entre la región promotora de los genes *luxI* y *lacZ*, $P_{luxI-lacZ}$, se obtuvo, en primer lugar, el plásmido pBG022. Para ello, el fragmento *EcoRI/BamHI* de 1,5 kb del plásmido pBG0801, que incluye 450 pares de bases de la región 5'-3' anteriores a *luxR*, *luxR* completo, la región intergénica de *luxRI* y 302 pares de bases del gen *luxI*, se clonó en pUC18*NotI*, igualmente digerido con *EcoRI* y *BamHI*. A continuación, el fragmento *EcoRI/PstI*, de 1,5 kb, de pBG022, se clonó en pSUP3535 previamente digerido con *EcoRI/PstI*. La estrategia para la construcción del plásmido obtenido, al que se ha denominado pBG0827, se presenta en la Figura 4.6, y la fusión transcripcional construida se indica en la Figura 4.1B. El plásmido pBG0827 se empleó, a su vez, para transformar células competentes de *E. coli* S17-1 que se utilizaron como donadoras para transferir la fusión $P_{luxI-lacZ}$, mediante cruces biparentales, a las cepas de *B. japonicum* USDA110, 0852, A9, N5097, 9043, 7403, B3, D21 y NWS, dando lugar a las cepas 0828, 0854, 0829, 0834, 0839, 0840, 0835, 0837 y 0838, respectivamente.

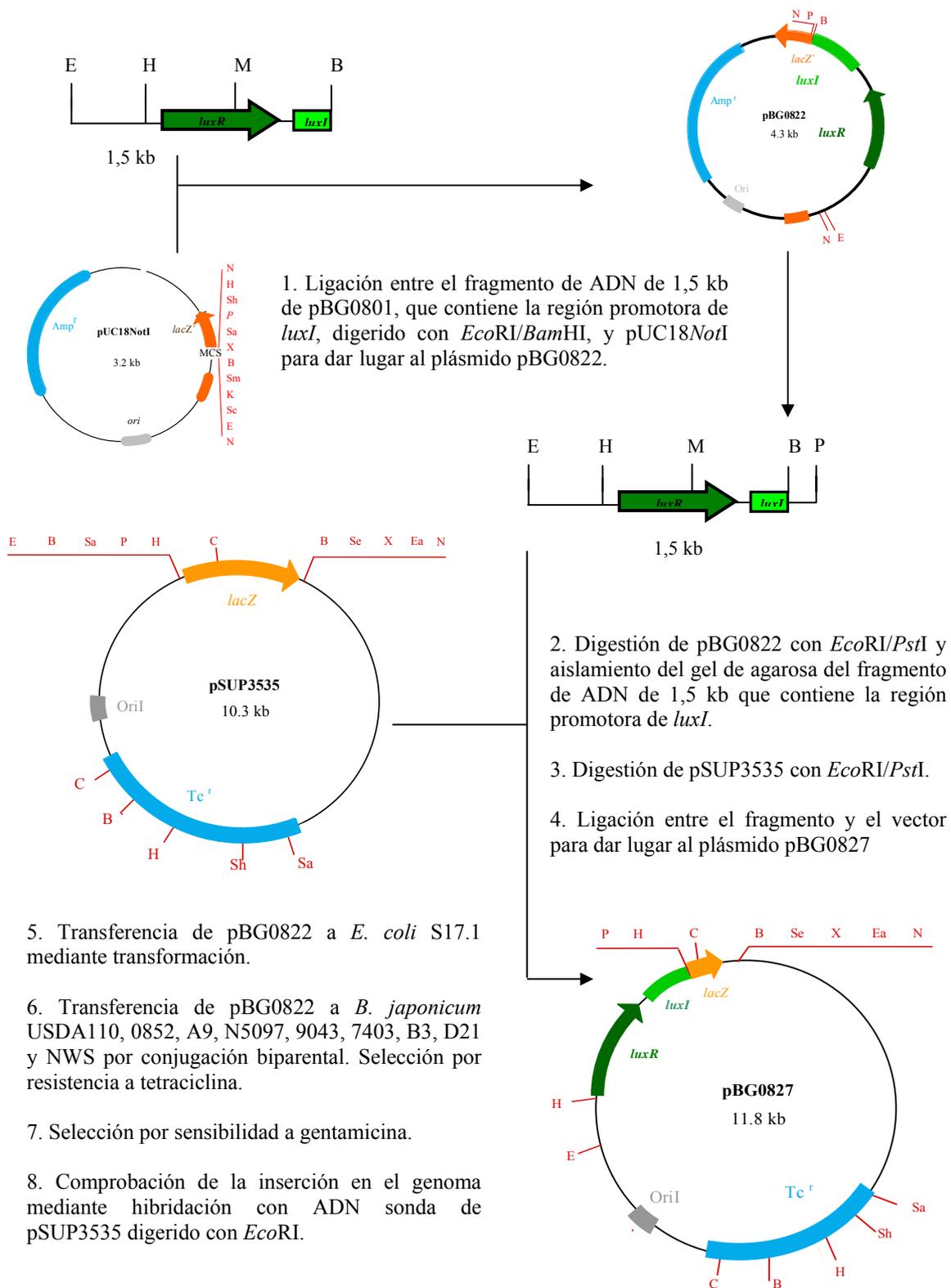


Figura 4.6. Construcción de una fusión transcripcional entre la región promotora de *luxI* y *lacZ* (P_{luxI} -*lacZ*). Se muestra la construcción del plásmido pBG0827 empleado para estudios de regulación. E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; M, *MluNI*; P, *PstI*; Sa, *SalI*; Sm, *SmaI*; N, *NotI*; Sh, *SphI*; X, *XbaI*; Sc, *SacI*; C, *Clal*; Ea, *EagI*; Se, *SpeI*.

Para construir la fusión entre *luxR* y *lacZ*, P_{luxR} -*lacZ*, el fragmento *EcoRI/KpnI* de 0,5 kb del plásmido pBG0801, que incluye 450 pares de bases de la región 5'-3' anteriores a *luxR* y únicamente 68 pares de bases de *luxR*, se clonó en pUC18*NotI* para dar lugar al plásmido pBG0833. Posteriormente, el fragmento *EcoRI/PstI*, del mismo tamaño que el anterior, se clonó en pSUP3535 para obtener el plásmido pBG0831. La estrategia para la construcción de pBG0831 se presenta en la Figura 4.7, y la fusión transcripcional construida se indica en la Figura 4.1C. Finalmente, el plásmido pBG0831 se empleó para transformar células competentes de *E. coli* S17-1 que se usó, a su vez, como cepa donadora para transferir la fusión P_{luxR} -*lacZ*, mediante cruces biparentales, a las cepas de *B. japonicum* USDA110 y 0852, dando lugar a las cepas 0832 y 0855, respectivamente.

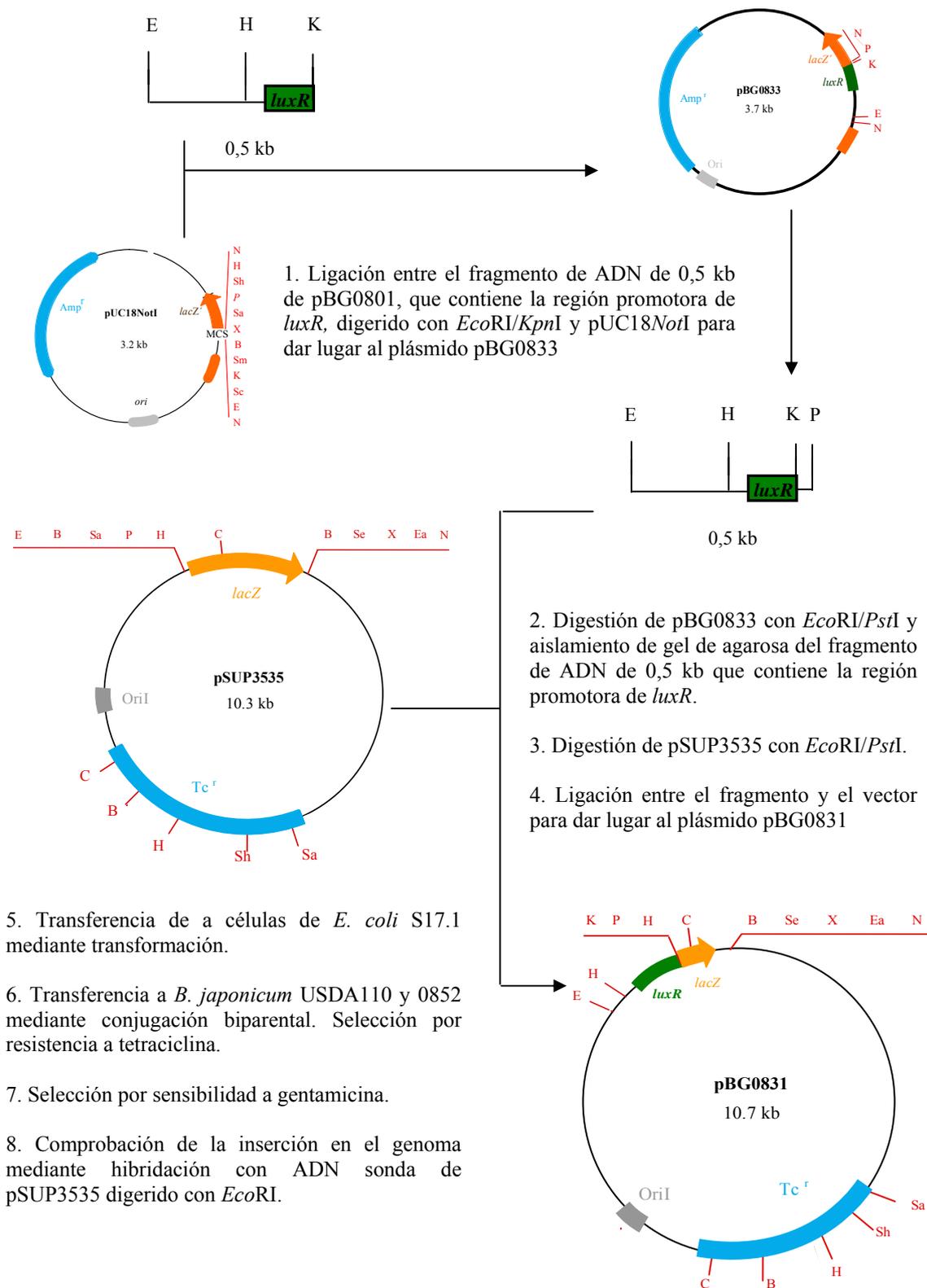


Figura 4.7. Construcción de una fusión transcripcional entre la región promotora de *luxR* y *lacZ* (P_{luxR} -*lacZ*). Se muestra la construcción del plásmido pBG0831 empleado para estudios de regulación. E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; M, *MluNI*; P, *PstI*; Sa, *Sall*; Sm, *SmaI*; N, *NotI*; Sh, *SphI*; X, *XbaI*; Sc, *SacI*; C, *ClaI*; Ea, *EagI*; Se, *SpeI*.

En todos los casos, en una primera ronda de selección se eligieron transconjugantes resistentes a tetraciclina y, en una segunda ronda, se seleccionaron aquellas que eran sensibles a gentamicina. La correcta estructura genómica de las cepas transconjugantes se comprobó mediante hibridación de su ADN genómico, previamente digerido con *Cla*I, con una sonda de ADN preparada a partir de la digestión de pSUP3535 con *Eco*RI. Mientras que no se detectó señal de hibridación alguna en el ADN de USDA110 y 0852, cada una de las cepas 0828, 0854, 0829, 0834, 0839, 0840, 0835, 0837 y 0838 presentaron tres señales de hibridación de 3,3 kb, 7,8 kb y 12,2 kb (14,2 kb en la cepa 0854). El ADN de cada una de las transconjugantes 0832 y 0855 presentaron también tres señales de hibridación de 2,3 kb, 7,8 kb y 12,2 kb (14,2 kb en la cepa 0855), respectivamente (Figura 4.8).

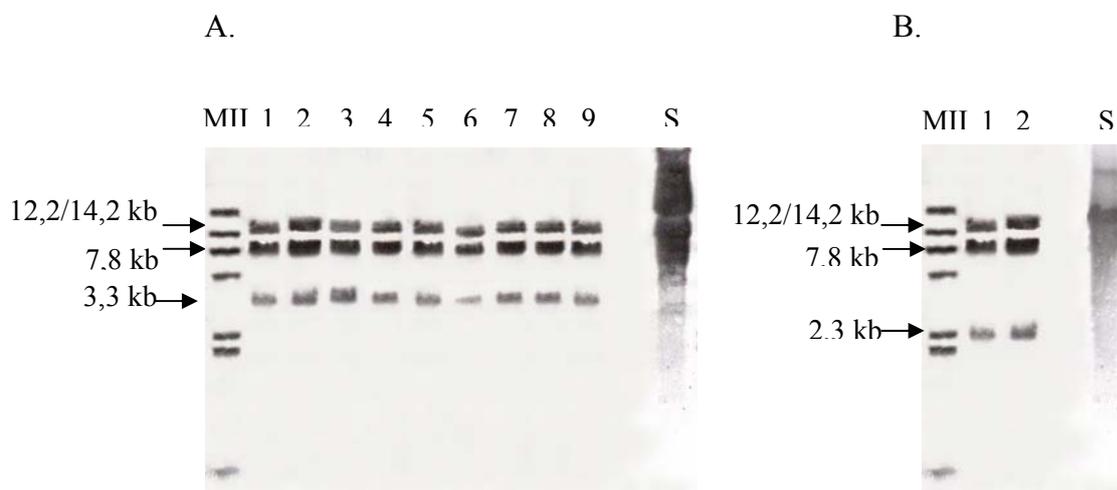
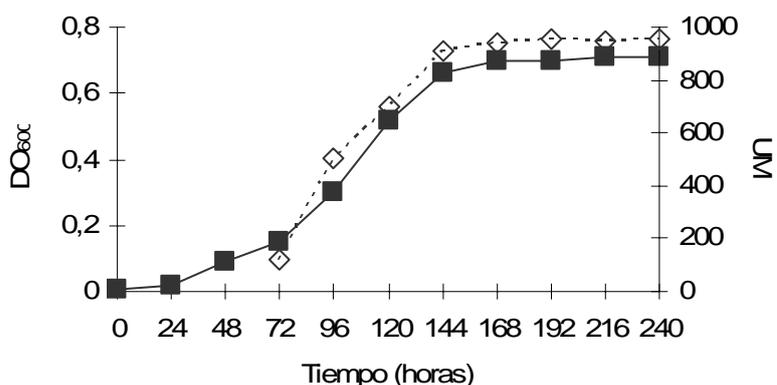


Figura 4.8. Detección de señales de hibridación en *B. japonicum*. Se empleó ADN genómico de *B. japonicum* USDA110, 0852, 0828, 0854, 0829, 0834, 0839, 0840, 0835, 0837, 0838, 0832 y 0855 digerido con *Cla*I. Como sonda de hibridación se utilizó el ADN del plásmido pSUP3535 digerido con *Eco*RI. A. Carriles: MII, marcador de tamaño molecular; 1-9, ADN genómico de las cepas 0828, 0854, 0829, 0834, 0839, 0840, 0835, 0837 y 0838. S, ADN de pSUP3535. B. Carriles: MII, marcador de tamaño molecular; 1-2, ADN genómico de las cepas 0832 y 0855. S, ADN de pSUP3535. Las flechas indican, en kb, el tamaño de las señales de hibridación. MII, genoma del fago λ digerido con *Hind*III y tratado con digoxigenina.

4.1.1.5.2. Efecto de la densidad celular

El efecto de la densidad celular de la población bacteriana sobre la expresión de *luxRI* se estudió, por una parte, determinando la actividad β -galactosidasa de la fusión P_{luxI} -*lacZ* durante el cultivo de *B. japonicum* 0828 y 0854 en medio PSY durante 10 días. En la cepa parental se detectó actividad β -galactosidasa a partir de las 72 h de cultivo, y su valor incrementó progresivamente con el aumento de la densidad celular de la población hasta alcanzar un valor de 910 unidades Miller a las 144 h, tiempo que coincidió con la entrada del cultivo en fase estacionaria de crecimiento (Figura 4.9A). En contraste con la cepa parental, la DO_{600} de la mutante 0854 incrementó con el tiempo, pero la actividad β -galactosidasa se mantuvo prácticamente constante, variando entre 287 y 335 unidades Miller durante la incubación (Figura 4.9B).

A.



B.

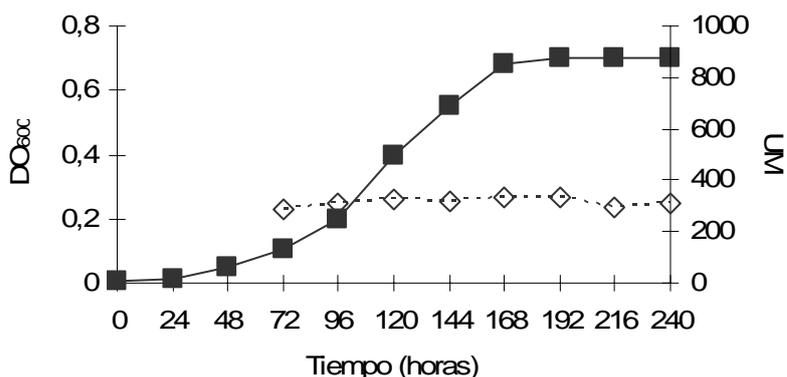
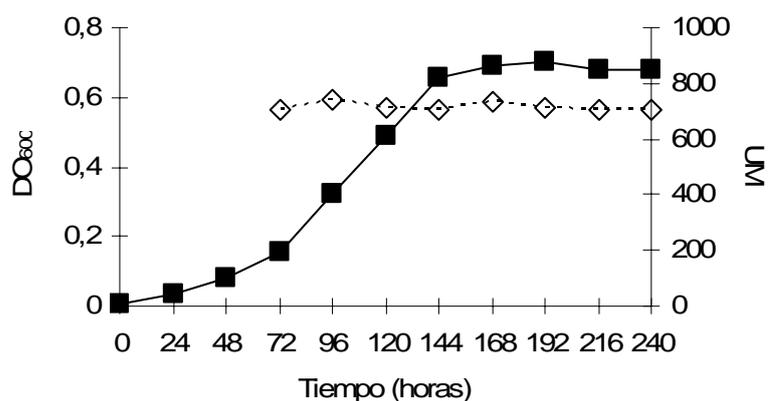


Figura 4.9. Efecto de la densidad celular de la población en la expresión de *luxI*. Se determinó como actividad β -galactosidasa de la fusión P_{luxI} -*lacZ* en *B. japonicum* 0828 (A) y 0854 (B). Los valores de densidad óptica y de actividad β -galactosidasa expresada en Unidades Miller (UM) representan la media de, al menos, tres repeticiones de dos cultivos diferentes. Los valores de la desviación estándar fueron inferiores al 15% para cualquier punto de la curva. Línea discontinua, actividad β -galactosidasa; línea continua, densidad óptica a 600 nm (DO_{600}).

Por otra parte, la expresión de *luxR* se estudió determinando la actividad β -galactosidasa de la fusión P_{luxR} -*lacZ* en *B. japonicum* 0832 y 0855 durante 10 días en medio PSY. La DO_{600} de ambas cepas incrementó con el tiempo (Figura 4.10, A y B). Sin embargo, mientras que la actividad β -galactosidasa de la cepa mutante se mantuvo constante durante la incubación, con valores que oscilaron entre 324 y 367 unidades Miller (Figura 4.10B), la actividad detectada en la parental varió entre 704 y 742 unidades Miller durante el cultivo (Figura 4.10A).

A.



B.

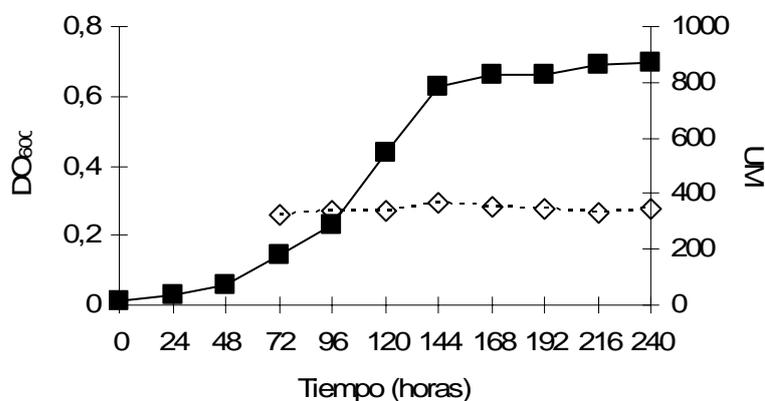


Figura 4.10. Efecto de la densidad celular de la población en la expresión de *luxR*. Se determinó como actividad β -galactosidasa de la fusión P_{luxR} -*lacZ* en *B. japonicum* 0832 (A) y 0855 (B). Los valores de densidad óptica y de actividad β -galactosidasa expresada en Unidades Miller (UM) representan la media de, al menos, tres repeticiones de dos cultivos diferentes. Los valores de la desviación estándar fueron inferiores al 15% para cualquier punto de la curva. Línea discontinua, actividad β -galactosidasa; línea continua, densidad óptica a 600 nm (DO_{600}).

4.1.1.5.3. Efecto de diferentes fondos genéticos

Las cepas 0828, 0854, 0829, 0834, 0839, 0840, 0835, 0837 y 0838 se cultivaron aeróbicamente en medio PSY durante 6 días, tiempo en que la DO_{600} fue, en todos los casos, superior a 0,5. La determinación de actividad β -galactosidasa (Tabla 3) al final del tiempo de incubación indicó que los valores de actividad de las cepas 0839 y 0840 fueron similares a los de la cepa 0828 utilizada como control, cuyo valor fue de 973 unidades Miller. La actividad determinada en las cepas 0829 y 0834 fue el 75% de la actividad de la parental, y sólo el 37% la de la cepa 0854. Las cepas 0835, 0837 y 0838 expresaron valores que fueron del 11% al 35% superiores al de la cepa parental.

Cepa de <i>B. japonicum</i>	Genotipo relevante	Actividad β -galactosidasa	
		UM	%
0828	USDA110- P_{luxI} - <i>lacZ</i>	973 \pm 53	100
0854	USDA110 <i>luxI</i> :: Ω - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	363 \pm 67	37
0829	USDA110 <i>spc4 nifA</i> :: <i>aphII</i> - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	729 \pm 58	75
0834	USDA110 <i>spc4 rpoN₁</i> :: <i>aphII rpoN₂</i> :: Ω - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	731 \pm 31	75
0840	USDA110 <i>spc4 fixL</i> :: <i>aphII</i> - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	914 \pm 35	94
0839	USDA110 <i>spc4 fixK₂</i> - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	934 \pm 22	96
0835	USDA110 <i>nolA</i> :: Ω - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	1121 \pm 37	115
0837	USDA110 <i>nodD2</i> :: Ω - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	1080 \pm 47	111
0838	USDA110 <i>nwsB</i> :: Ω - P_{luxI} - <i>lacZ</i>	1324 \pm 56	135

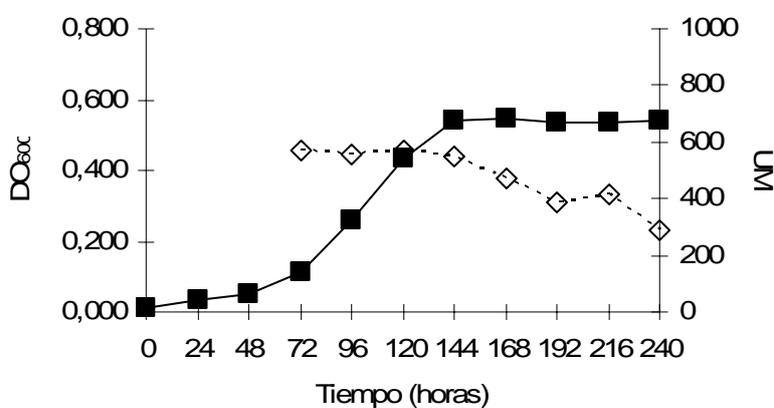
Tabla 4.3. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{luxI} -*lacZ* en diferentes fondos genéticos.

Las cepas de *B. japonicum* 0828, 0854, 0829, 0834, 0840, 0839, 0835, 0837 y 0838 se cultivaron aeróbicamente en medio PSY durante 6 días. Para la incubación en condiciones limitantes de oxígeno, las células se cultivaron primero aeróbicamente en PSY, se lavaron y se traspasaron a recipientes cerrados que contenían PSY adicionado de 10 mM de KNO_3 . Los valores de actividad β -galactosidasa, expresada en Unidades Miller (UM), representan la media de, al menos, tres repeticiones de dos cultivos diferentes, seguida de la desviación estándar.

4.1.1.5.4. Efecto de la anoxia

Para estudiar el efecto de la limitación de oxígeno en la expresión de los genes *lux*, las cepas 0828 y 0854 de *B. japonicum* se cultivaron durante 10 días en tubos llenos de medio YEMN cerrados herméticamente para alcanzar condiciones anóxicas. En ambos casos, el incremento de la DO_{600} durante el crecimiento celular no se acompañó del aumento de la actividad β -galactosidasa, que se mantuvo relativamente constante durante la incubación (Figura 4.11, A y B), aunque se observó una ligera disminución de actividad al final del período de crecimiento, que fue más significativa en la cepa parental (Figura 4.11A).

A.



B.

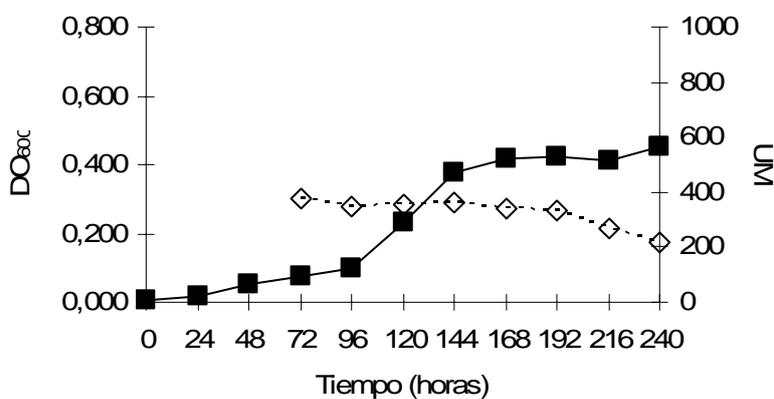
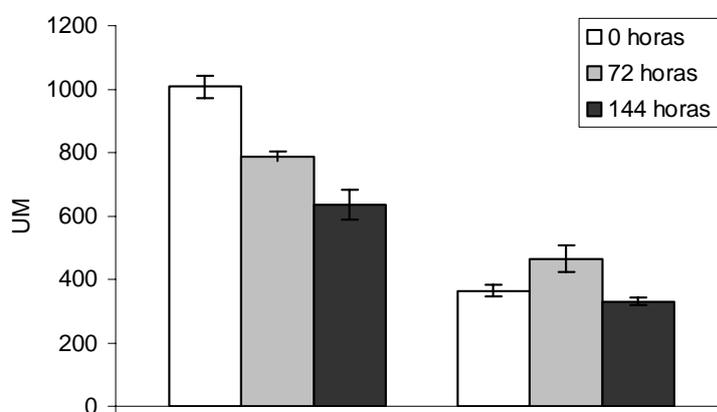


Figura 4.11. Efecto de la anoxia en la expresión de los genes *lux*. Se determinó como actividad β -galactosidasa de la fusión $P_{lux}-lacZ$ de las cepas de *B. japonicum* 0828 (A) y 0854 (B). Los valores de actividad β -galactosidasa expresada en Unidades Miller (UM) representan la media de, al menos, tres repeticiones de dos cultivos diferentes. Línea discontinua, actividad β -galactosidasa; línea continua, densidad óptica a 600 nm (DO_{600}).

Para comprobar el efecto de la anoxia sobre la expresión de los genes *lux*, las cepas parental y mutante se cultivaron aeróbicamente en medio PSY, posteriormente se lavaron, se inocularon, hasta alcanzar una DO_{600} de 0,2, en tubos llenos de medio YEMN cerrados herméticamente, y se incubaron durante 6 días. La actividad β -galactosidasa se analizó en alícuotas de los cultivos a las 0, 72 y 144 h de incubación. A pesar del incremento en la DO_{600} de la población celular, los valores de actividad β -galactosidasa de la cepa parental disminuyeron desde 1.008 hasta 634 unidades Miller durante el tiempo de incubación, mientras que los de la cepa mutante permanecieron relativamente constantes (Figura 4.12).



<i>B. japonicum</i> 0854				
Tiempo (h)	DO_{600}		Actividad β -galactosidasa	
	0828	0854	0828	0854
0	0,200 ± 0,002	0,200 ± 0,005	1008 ± 35	364 ± 19
72	0,347 ± 0,012	0,354 ± 0,015	787 ± 15	465 ± 42
144	0,557 ± 0,021	0,489 ± 0,014	634 ± 47	331 ± 13

Figura 4.12. Efecto de la anoxia en la expresión de los genes *lux*. Se determinó como actividad β -galactosidasa de la fusión P_{luxI} -*lacZ* de las cepas de *B. japonicum* 0828 y 0854. Los valores de actividad β -galactosidasa expresada en Unidades Miller (UM) representan la media \pm error estándar de 12 repeticiones de dos cultivos diferentes.

Las cepas 0829, 0834, 0835, 0837, 0838, 0839 y 0840 se emplearon para inocular tubos llenos de medio YEMN hasta alcanzar una DO_{600} de 0,2. Estos tubos se cerraron herméticamente y se incubaron en microaerobiosis durante 6 días. Las

diferencias de expresión entre cepas fueron similares a las observadas en aerobiosis, siendo los valores finales de expresión inferiores a los determinados al final de la incubación aeróbica.

4.1.1.5.5. Efecto del hierro

Para estudiar el efecto del hierro sobre la expresión de actividad β -galactosidasa debida a la fusión entre *luxI* y *lacZ*, las células de *Bradyrhizobium japonicum* 0828 cultivadas en PSY durante 4 días se centrifugaron, se lavaron tres veces en medio Bergersen (sin Fe^{3+} adicionado), se inocularon en el mismo medio que contenía 0, 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM de FeCl_3 y, finalmente, se incubaron durante 48 h. La actividad β -galactosidasa incrementó al aumentar la concentración de FeCl_3 en el medio hasta alcanzar un valor máximo de 925 unidades Miller en presencia de 100 μM , concentración a partir de la cual no se observaron incrementos significativos de actividad (Figura 4.13).

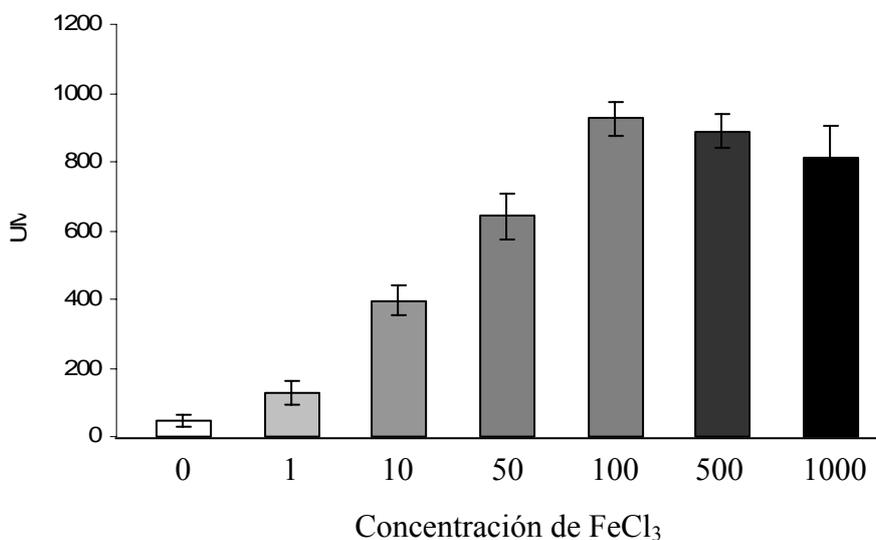
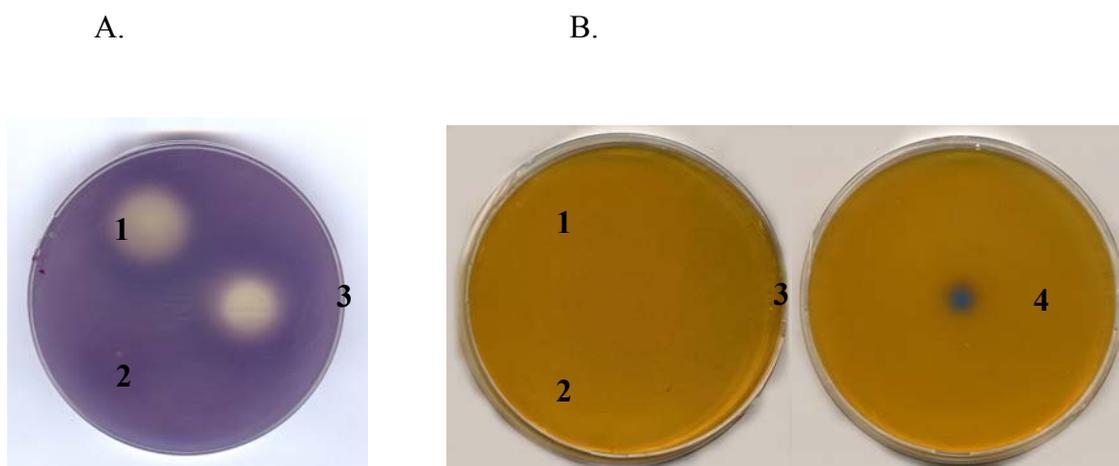


Figura 4.13. Efecto del hierro (Fe^{3+}) en la expresión de *luxI*. Se determinó como actividad β -galactosidasa de la fusión P_{luxI} -*lacZ* en *B. japonicum* 0828 en presencia de diferentes concentraciones de FeCl_3 (μM). Los valores de actividad β -galactosidasa expresada en Unidades Miller (UM) representan la media de, al menos, doce repeticiones, seguida de la desviación estándar.

4.2. Autoinductores en *B. japonicum*

4.2.1. Detección

La presencia de autoinductores en extractos de los sobrenadantes libres de células de cultivos en medio PSY de *B. japonicum* USDA110, 0852 y 0853 se determinó mediante bioensayos utilizando *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 como biomarcadores. Mientras que el ensayo reverso con *C. violaceum* CV026 detectó actividad autoinductora en los extractos de las cepas parentales USDA110 y 0853, sólo se observó una débil señal en el de la mutante *luxI* (Figura 4.14A). El ensayo directo con *C. violaceum* CV026 no produjo ninguna señal en *B. japonicum*, aunque detectó actividad autoinductora en *R. leguminosarum* A34 (Figura 4.14B). Cuando se empleó *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 como biomarcador, se obtuvo resultado positivo en los extractos de las tres cepas y, de nuevo, la señal correspondiente a la cepa parental fue mayor que la de la mutante (Figura 4.13C). De acuerdo con los resultados obtenidos, los bioensayos restantes se llevaron a cabo utilizando el ensayo reverso de *C. violaceum* CV026 y el de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4.



C.

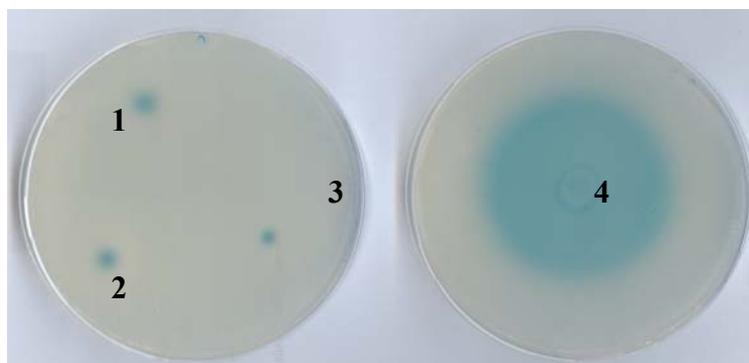
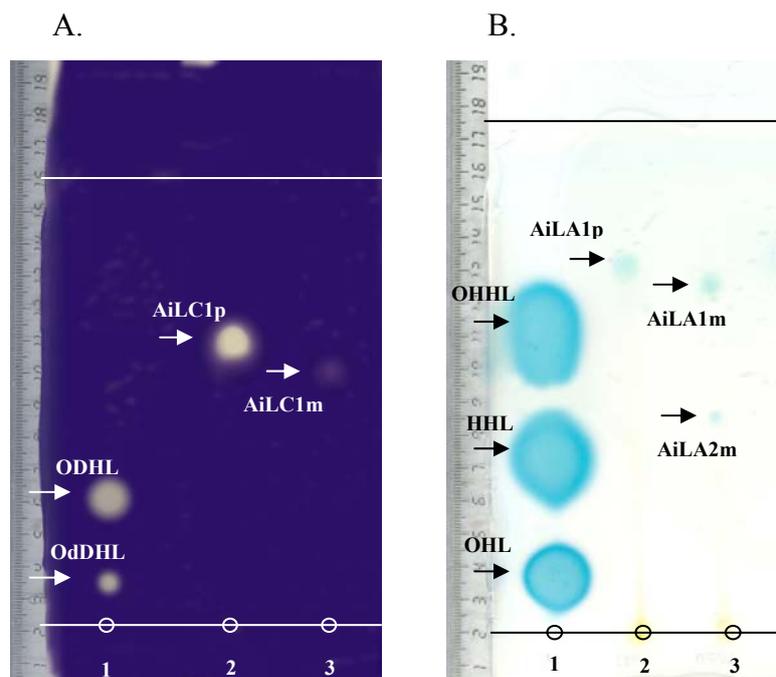


Figura 4.14. Detección de autoinductores en *B. japonicum*. A. Bioensayo reverso con *C. violaceum* CV026. B. Bioensayo directo con *C. violaceum* CV026. C. Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Cada muestra corresponde a 125 ml equivalentes del sobrenadante libre de células de *B. japonicum* USDA110 (1), 0852 (2) y 0853 (3). *R. leguminosarum* A34 (4) se utilizó como control en el ensayo directo de *C. violaceum* CV026 y en el de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4.

4.2.2. Cuantificación

Se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina del extracto equivalente a 125 ml de sobrenadante libre de células. Después de la electroforesis, el empleo de *C. violaceum* CV026 para revelar la cromatoplaca permitió detectar un único compuesto en cada uno de los extractos de *B. japonicum* USDA110 y 0852, a los que se ha denominado AiLC1p y AiLC1m, cuyos R_f s fueron 0,64 y 0,58, respectivamente. La intensidad de la señal debida a AiLC1m fue mucho menor que la producida por AiLC1p. Por otra parte, el revelado de las cromatoplasas con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 indicó la presencia de un único autoinductor, AiLA1p, en el extracto del sobrenadante de la cepa parental cuyo R_f fue 0,71 (Figura 4.15B, carril 2). Sin embargo, se detectaron dos compuestos, AiLA1m y AiLA2m, con actividad autoinductora en el de la cepa 0852, cuyos R_f s fueron 0,68 y 0,41, respectivamente.



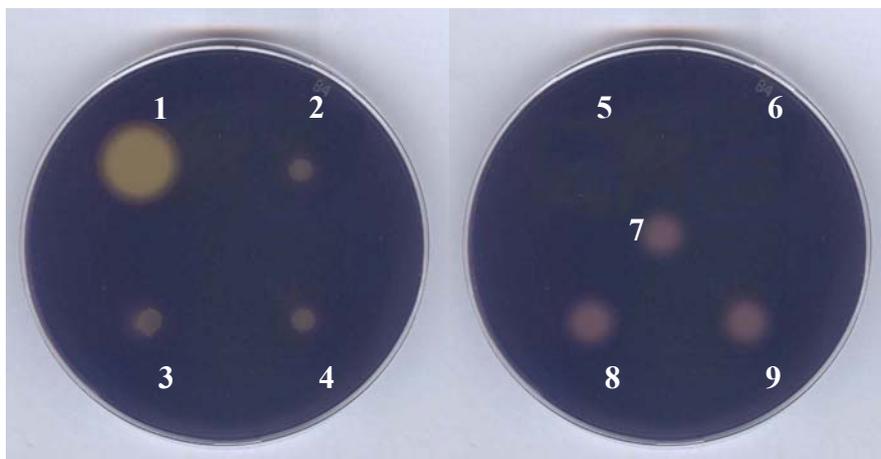
Biomarcador	Carril	Cepa/Marcador	Compuesto	R _f
<i>A. C. violaceum</i> CV026	1	Marcador	ODHL OdDHL	0,31 0,11
	2	USDA110	AiLC1p	0,64
	3	0852	AiLC1m	0,58
<i>B. A. tumefaciens</i> NTLA-pZLR4	1	Marcador	OHHL HHL OHL	0,58 0,35 0,11
	2	USDA110	AiLA1p	0,71
	3	0852	AiLA1m AiLA2m	0,68 0,41

Figura 4.15. Cromatografía en capa fina de extractos de sobrenadantes libres de células de *B. japonicum*. A. Bioensayo con *C. violaceum* CV026. B. Bioensayo con *A. tumefaciens* NTLA-pZLR4. Cada carril contenía 125 ml equivalentes de extracto. Se utilizaron cromatoplasmas de fase reversa C₁₈ y una mezcla de metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. En la tabla adjunta a la figura se indica la cepa utilizada como biomarcador, las cepas de *B. japonicum* analizadas, los marcadores utilizados y el R_f de los autoinductores detectados.

4.2.3. Autoinductores en diferentes fondos genéticos

El empleo de *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 como biomarcadores en ensayos en placa Petri permitió detectar, en ambos casos, actividad autoinductora en los extractos de los sobrenadantes de las cepas A9, 9043, B3, D21 y NWS (Figura 4.16). Los extractos de las cepas 7403 y N5097 no mostraron actividad autoinductora con *C. violaceum* CV026, mientras que con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 el resultado del bioensayo fue positivo para ambas cepas.

A.



B.

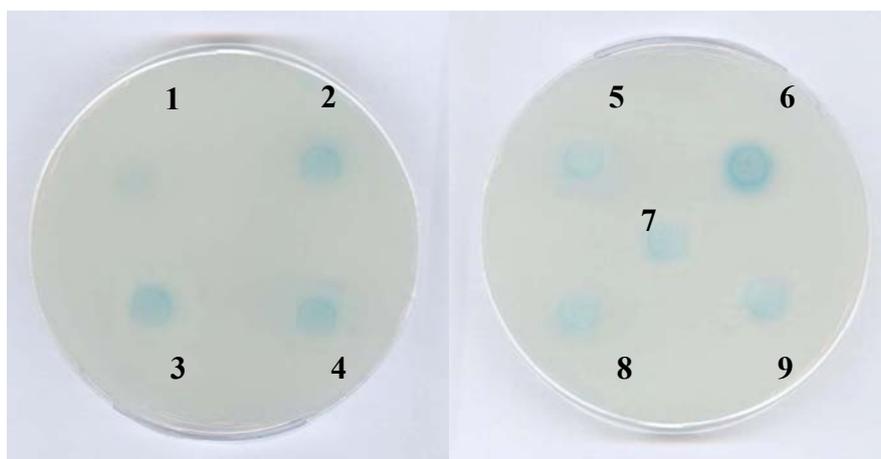
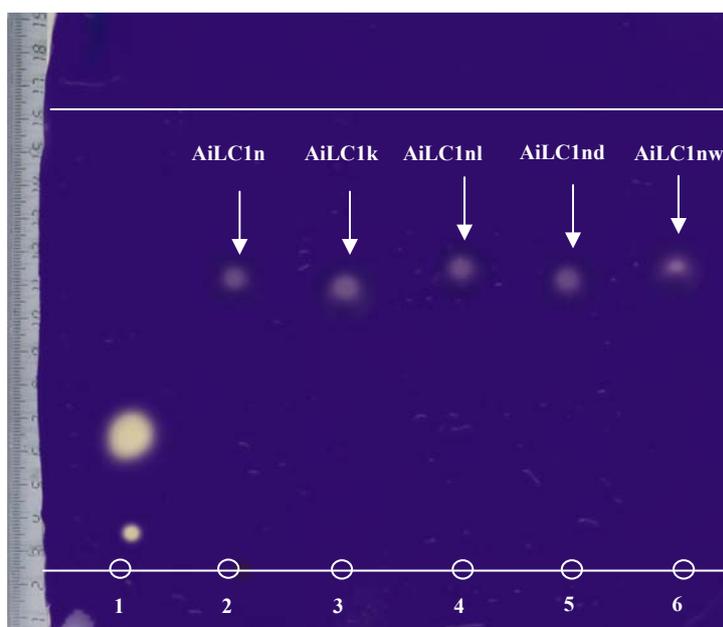


Figura 4.16. Detección de autoinductores en *B. japonicum*. A. Bioensayo reverso con *C. violaceum* CV026. B. Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Cada muestra corresponde a 125 ml equivalentes del sobrenadante libre de células de *B. japonicum*. 1, USDA110; 2, 0852; 3, A9; 4 9043; 5 7403; 6, N5097; 7, B3; 8, D21; 9, NWS.

La cromatografía en placa de fase reversa C_{18} y posterior revelado de la cromatoplaaca con *C. violaceum* CV026 demostró la existencia de un único compuesto con actividad autoinductora en cada uno de los sobrenadantes de las cepas A9, 9043, B3, D21 y NWS (Figura 4.17A, carriles 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente). Los R_f s, cuyos valores se indican en la tabla adjunta a la figura, son muy próximos al de AiLC1p de *B. japonicum* USDA110 (Figura 4.15A, carril 2).

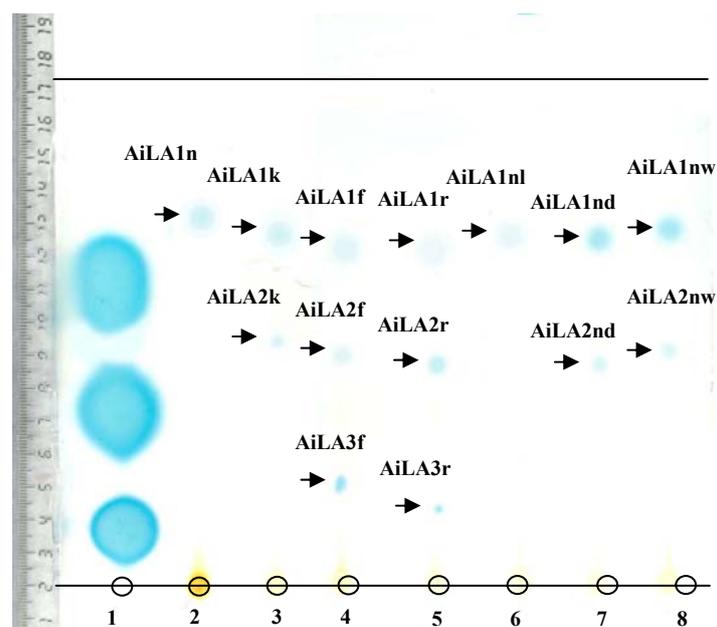
El revelado con *A. tumefaciens* NTLA-pZLR4 (Figura 4.17B) reveló la presencia de un único compuesto con actividad autoinductora en las cepas A9 (carril 2) y B3 (carril 6), dos compuestos en las cepas 9043 (carril 3), D21 (carril 7) y NWS (carril 8), y hasta tres compuestos en las cepas 7403 (carril 4) y N5097 (carril 5). El R_f de cada uno de los compuestos se indica en la tabla adjunta a la figura.

A.



Carril	Cepa/Marcador	Compuesto	R_f
1	Marcador	ODHL	0,30
		OdDHL	0,10
2	A9	AiLC1n	0,62
3	9043	AiLC1k	0,60
4	B3	AiLC1nl	0,64
5	D21	AiLC1nd	0,62
6	NWS	AiLC1nw	0,65

B.



Carril	Cepa/Marcador	Compuesto	Rf
1	Marcador	OHHL	0,58
		HHL	0,35
		OHL	0,11
2	A9	AiLA1n	0,71
3	9043	AiLA1k	0,70
		AiLA2k	0,50
4	7403	AiLA1f	0,67
		AiLA2f	0,46
		AiLA3f	0,21
5	N5097	AiLA1r	0,66
		AiLA2r	0,43
		AiLA3r	0,17
6	B3	AiLA1nl	0,70
7	D21	AiLA1nd	0,69
		AiLA2nd	0,43
8	NWS	AiLA1nw	0,72
		AiLA2nw	0,47

Figura 4.17. Cromatografía en capa fina de extractos de sobrenadantes libres de células de *B. japonicum*. A. Bioensayo con *C. violaceum* CV026. B. Bioensayo con *A. tumefaciens* NTLA-pZLR4. Cada carril contenía 125 ml equivalentes de extracto. Se utilizaron cromatoplasmas de fase reversa C₁₈ y una mezcla de metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. En la tabla adjunta a la figura se indica la cepa de origen del extracto del sobrenadante cargado en cada carril y se muestran los R_fs de los compuestos detectados.

4.3. Autoinductores en la simbiosis *B. japonicum*-soja

4.3.1. Inoculación de plantas

Para estudiar el efecto que la mutación en el gen *luxI* podría ejercer en la simbiosis *B. japonicum*-soja se inocularon, de manera independiente, plantas con las cepas USDA110 y 0852, que se cultivaron durante 35 días dependiendo únicamente de la fijación de N₂. No se observaron diferencias significativas en el número de nódulos y peso seco de las plantas, ni en los contenidos de leghemoglobina y N (Tabla 4).

Cepa de <i>B. japonicum</i>	Peso seco g/planta	Número de nódulos	Leghemoglobina mg/g peso fresco de nódulos	Nitrógeno fijado mg/l
USDA110	1,58 a	61,75 a	9,00 a	45,67 a
0852	1,55 a	58,33 a	10,00 a	43,99 a

Tabla 4. Peso seco de planta, número de nódulos por planta, y contenido en N y en leghemoglobina de nódulos de soja. Las plantas de soja se inocularon, de forma independiente, con las cepas USDA110 y 0852 de *B. japonicum* y se cultivaron durante 35 días en ausencia de nitrógeno combinado. Los valores representan la media de 12 repeticiones. En la misma columna, los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas según el test de Fisher ($P \leq 0.05$).

4.3.2. Microscopía óptica y electrónica de transmisión de cortes de nódulos

El análisis de microscopía realizado incluye un estudio de microscopía óptica y otro de microscopía electrónica. Las microfotografías de microscopía óptica no muestran diferencias apreciables entre los nódulos producidos por la cepa parental (Figura 4.18.1) y la cepa mutante (Figura 4.18.2). Sin embargo las microfotografías al microscopio electrónico revelan marcadas diferencias en los nódulos producidos por ambas cepas.

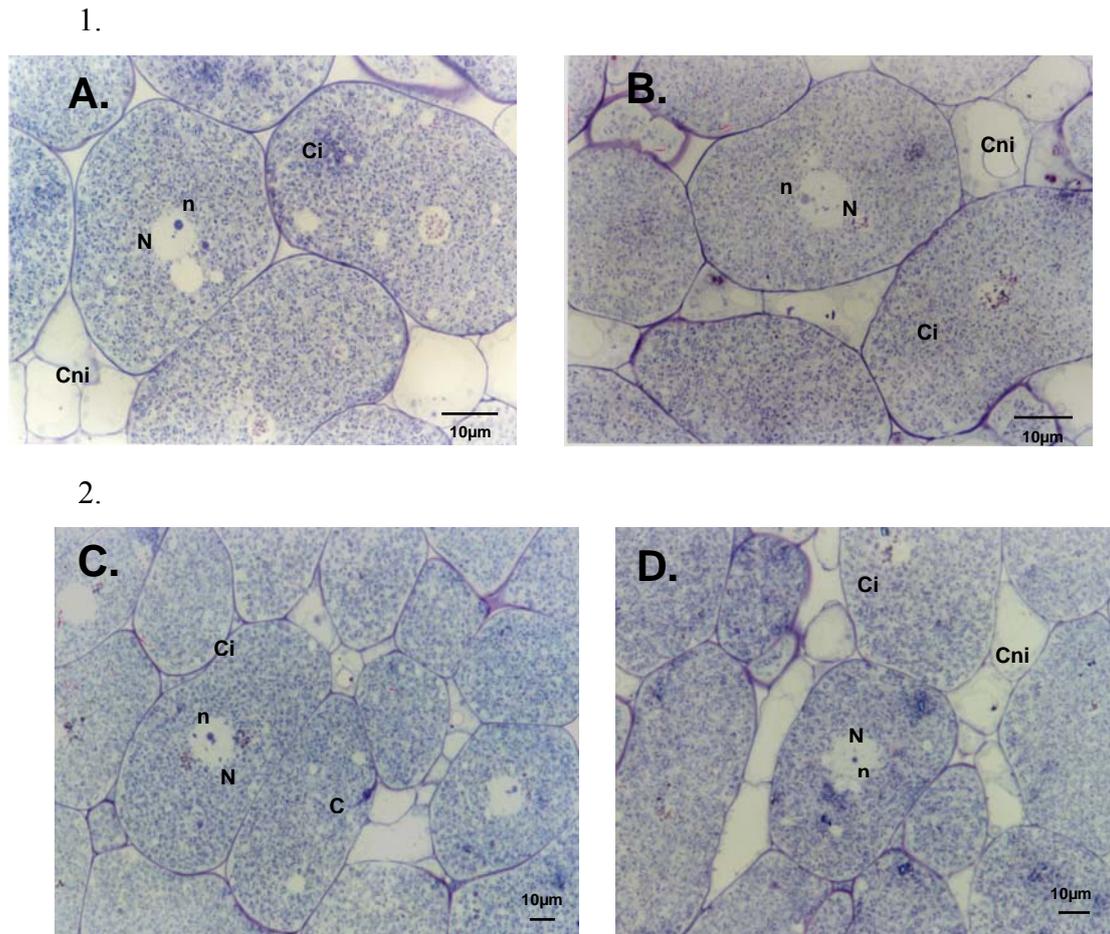


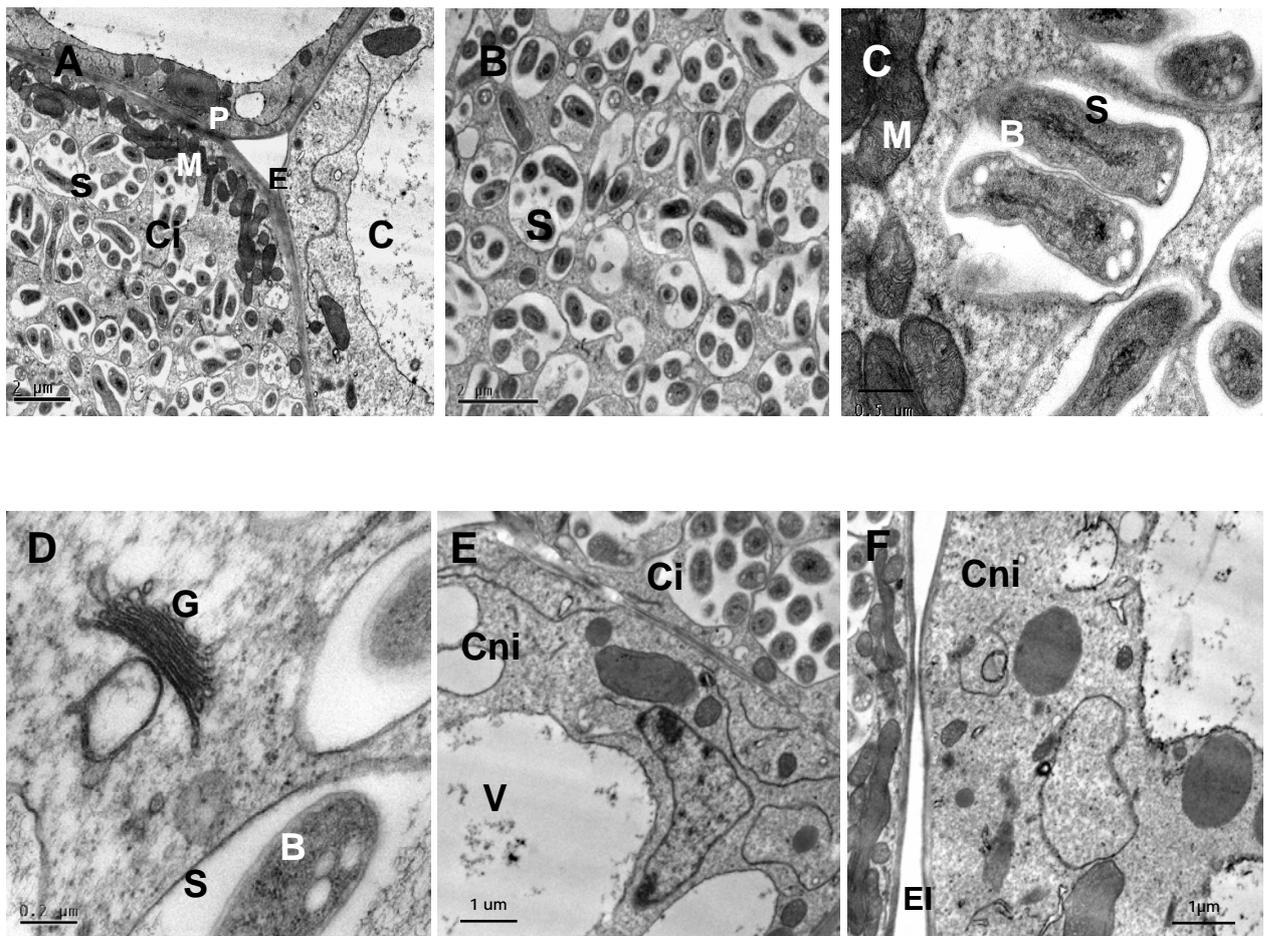
Figura 4.18. Microscopía óptica de cortes semifinos de nódulos de soja. Las micrografías corresponden a los nódulos formados por *B. japonicum* USDA110 (panel 1) y 0852 (panel 2). Los nódulos seleccionados para el estudio morfológico se han tomado tanto de raíces principales (A.), como de raíces secundarias (B.). En los paneles se distinguen los siguientes elementos: Ci, célula infectada; Cni, célula no infectada; N, núcleo; n, nucleolo.

Las microfotografías al microscopio electrónico de los cortes ultrafinos de los nódulos formados por la cepa parental mostraron una estructura típica de nódulos maduros y activos como lo indica la abundancia y normal estructura de los orgánulos celulares como mitocondrias (Figura 4.19.1, paneles A, C y F), núcleos (Figura 4.19.1, panel E), peroxisomas (Figura 4.19.1, paneles A, E y F), aparato de Golgi (Figura 4.19.1, panel D), y retículo endoplásmico (Figura 4.19.1, paneles E y F), tanto en las células infectadas como en las no infectadas. En las células infectadas se observaron numerosos simbiosomas (Figura 4.19.1, paneles A, B y C) ocupados por un número variable de bacteroides. También se observó un elevado número de mitocondrias que

aparecen alrededor de los espacios intercelulares formados por las células no infectadas (Figura 4.19.1, paneles A, E y F).

En los nódulos producidos por la cepa mutante se observó una senescencia precoz con respecto al control (Figura 4.19.2), encontrándose tanto células en buen estado de conservación como células degradadas donde los simbiosomas están dañados. Estos simbiosomas han perdido la membrana peribacteroidal y los bacteroides aparecen libres en el citoplasma. Se pueden observar algunas células infectadas empezando a degradarse al lado de células infectadas en buen estado de conservación. En las primeras se aprecian menos simbiosomas, con bacteroides dañados estructuralmente. Además se observa una disminución del número de mitocondrias, estando visiblemente dañadas las existentes (Fig 4.19.2 A, B). En las células no infectadas aumenta el número de peroxisomas, lo cual es una clara evidencia de senescencia (Fig 4.19.2 C, D).

1.



2.

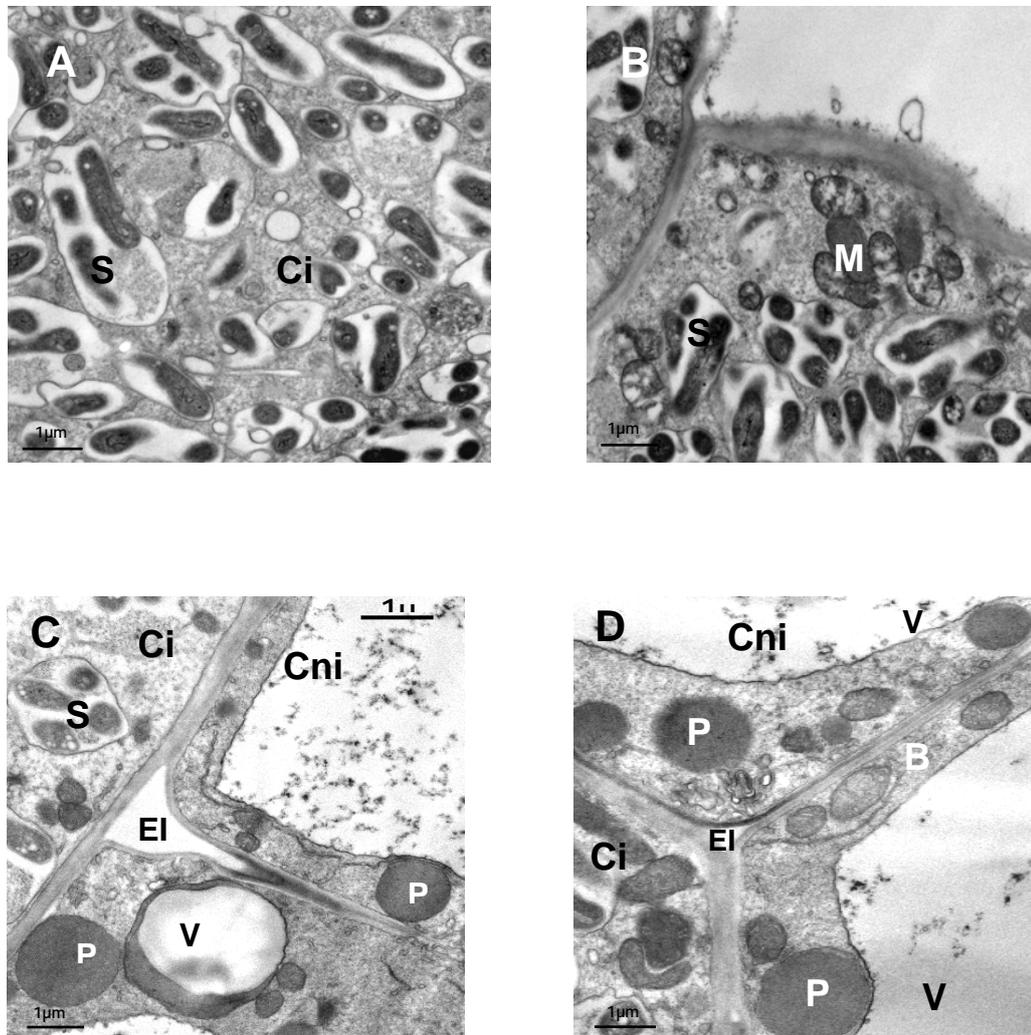


Figura 4.19. Microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de nódulos de soja. Las micrografías corresponden a nódulos formados por *B. japonicum* USDA110 (panel 1) y 0852 (panel 2). En los paneles se distinguen los siguientes elementos: B, bacteroide; Ci, célula infectada; Cni, célula no infectada; EI, espacio intercelular; G, Golgi; M, mitocondrias; N, núcleo; P, peroxisomas; S, simbiosoma; V, Vacuola.

4.3.3. Expresión de *luxI* en nódulos

Para estudiar la expresión de *luxI* en la simbiosis, las plantas de soja se inocularon, de forma independiente, con las cepas 0828 y 0854 de *B. japonicum* y se cultivaron durante 35 días en jarras Leonard dependiendo exclusivamente de la fijación de N₂. Los nódulos se recogieron y, después de su homogeneización, se obtuvo el citosol de los nódulos y el citosol de los bacteroides. La actividad β-galactosidasa en citosol de los nódulos formados por la cepa parental fue 1,5 veces mayor que la del citosol de los nódulos de la cepa mutante (Tabla 5). De manera similar, el citosol de los bacteroides de la cepa parental presentó 4,6 más actividad β-galactosidasa que el de los bacteroides de la cepa mutante (Tabla 5).

Cepa de <i>B. japonicum</i>	Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller x 10 ³ /mg de proteína)	
	Citosol	Bacteroide
0828	464 ± 8	320 ± 2
0854	318 ± 14	69 ± 4

Tabla 5. Actividad β-galactosidasa en el citosol de los nódulos y de los bacteroides formados por las cepas 0828 y 0854. Los valores representan la media de, al menos tres repeticiones, seguida de la desviación estándar.

4.3.4. Detección y cuantificación de autoinductores en nódulos

La presencia de autoinductores en nódulos de soja formados por *B. japonicum* USDA110 y 0852 se determinó tanto en el citosol del nódulo como en el de los bacteroides mediante bioensayos en placa Petri (Figura 4.20). El revelado de las placas tanto con *C. violaceum* CV026 (Figura 4.20A) como con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 (Figura 4.20B) demostró la existencia de actividad autoinductora en todos los casos.

Para cuantificar el número de posibles autoinductores en ambas fracciones, alícuotas de los extractos correspondientes en acetato de etilo se aplicaron a una cromatoplaque de fase reversa C₁₈, empleando metanol:agua (60%:40%) para la cromatografía. El revelado de la placa mediante *C. violaceum* CV026 detectó una única señal, AiSnC1p en el extracto del citosol de nódulos formados por la cepa USDA110

(Figura 4.21A, carril 2) cuyo R_f coincidió con el de AiLC1p (Figura 4.21A, carril 1). No se detectó actividad en los extractos de citosol de nódulos ni de bacteroides de nódulos formados por la cepa 0852.

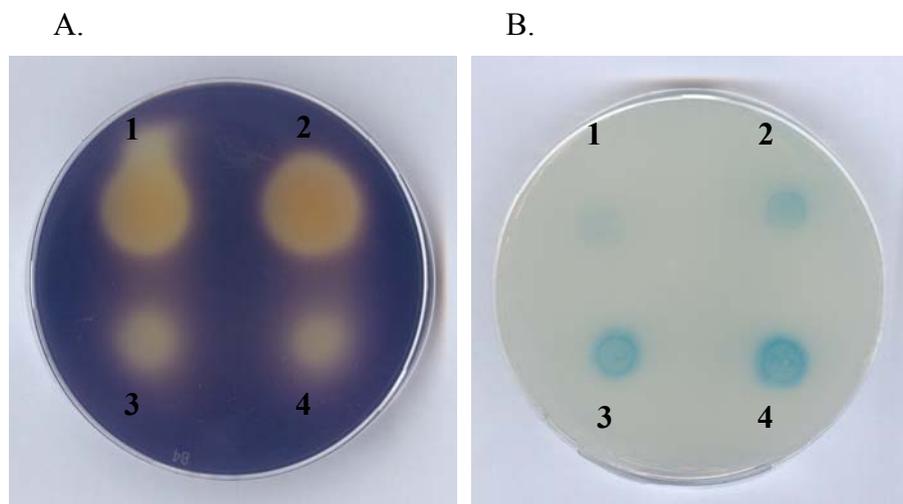
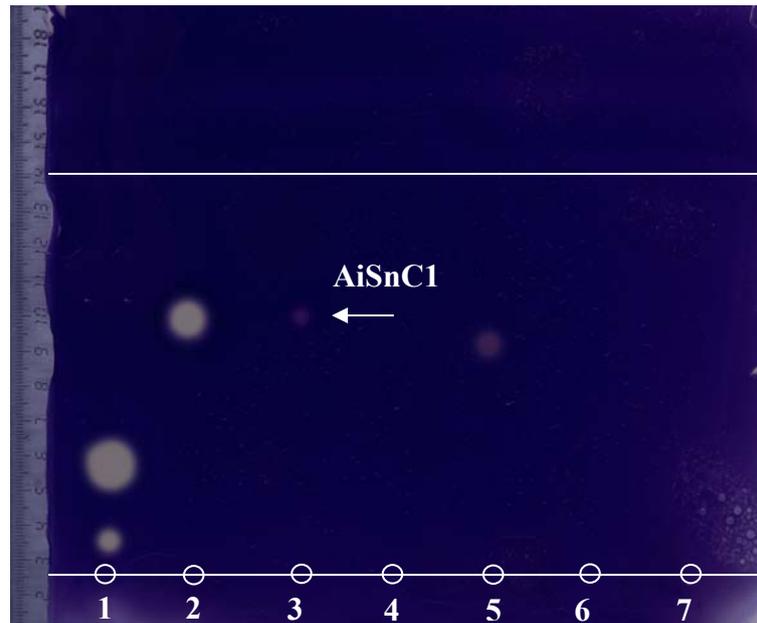


Figura 4.20. Detección de autoinductores en nódulos. A. Bioensayo reverso con *C. violaceum* CV026. B. Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. 1, citosol de los nódulos formados por *B. japonicum* USDA110; 2, citosol de los nódulos formados por *B. japonicum* 0852; 3, citosol de los bacteroides de *B. japonicum* USDA110; 4, citosol de los bacteroides de *B. japonicum* 0852. Cada pocillo contenía 200 μ l de citosol de nódulos o de citosol de bacteroides.

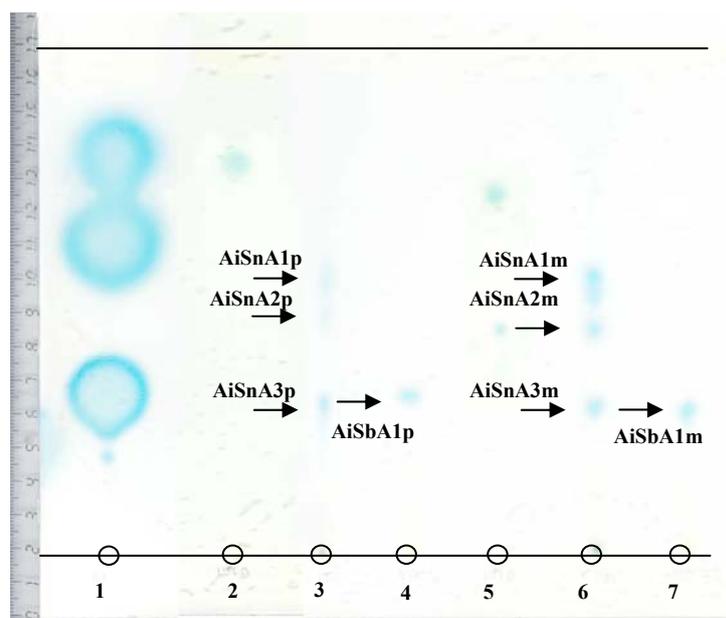
El bioensayo con *A. tumefaciens* NTLA-pZLR4 (Figura 4.21B) demostró la presencia de tres señales en el citosol de los nódulos (carriles 3 y 6) y de una sola señal en el citosol de los bacteroides (carriles 4 y 7), tanto para nódulos formados por la cepa USDA110 (carriles 3 y 4) como para nódulos formados por la cepa 0852 (carriles 6 y 7). Las moléculas detectadas en el citosol de los nódulos y bacteroides se han denominado AiSnA1p, AiSnA2p, AiSnA3p, y AiSbA1p para las moléculas de nódulos formados por la cepa parental y AiSnA1m, AiSnA2m, AiSnA3m y AiSbA1m, para las moléculas de nódulos formados por la cepa mutante. Los respectivos R_f s de las citadas moléculas se muestran en la tabla adjunta a la figura.

A.



Cepa/Marcador	Carril	Vida libre/Nódulos	Compuesto	R _f
Marcador	1	----	ODHL	0,26
			OdDHL	0,09
USDA110	2	Vida libre	AiLC1p	0,65
	3	Citosol nódulos	AiSnC1p	0,65
	4	Citosol bacteroides	no se detecta	----
0852	5	Vida libre	AiLC1m	0,57
	6	Citosol nódulos	no se detecta	----
	7	Citosol bacteroides	no se detecta	----

B.



Cepa/Marcador	Carril	Vida libre/Nódulos	Compuesto	R _f
Marcador	1	----	OHHL	0,77
			HHL	0,60
			OHL	0,30
USDA110	2	Vida libre	AiLA1p	0,76
			AiSnA1p	0,53
	3	Citosol nódulos	AiSnA2p	0,46
			AiSnA3p	0,29
4	Citosol bacteroides	AiSbA1p	0,30	
0852	5	Vida libre	AiLA1m	0,70
			AiLA2m	0,43
			AiSnA1m	0,53
	6	Citosol nódulos	AiSnA2m	0,46
			AiSnA3m	0,29
7	Citosol bacteroides	AiSbA1m	0,26	

Figura 4.21. Cromatografía en capa fina de autoinductores en nódulos. A. Bioensayo reverso con *C. violaceum* CV026. B. Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Carriles 2 y 5, extracto correspondiente a 125 ml equivalentes del sobrenadante libre de células de cultivos en vida libre de las cepas de *B. japonicum* USDA110 y 0852, respectivamente. Carriles 3 y 4 y 6 y 7, extracto equivalente al citosol del nódulo y citosol de los bacteroides obtenidos a partir de 7 g de nódulos de soja. En la tabla adjunta a la figura se indica el origen del extracto cargado en cada carril y se muestran los R_fs de los compuestos detectados.

4.4. Purificación de autoinductores de *B. japonicum* USDA110

4.4.1. Purificación por cromatografía de líquidos en soporte sólido (LSC)

El extracto correspondiente a los 120 l de sobrenadante bacteriano aplicado a una columna de sílica gel y eluido con mezclas de hexano, éter, acetato de etilo y metanol se recogió como se indica a continuación:

- 1°	200 ml hexano	Matraz A
- 2°	100 ml hexano-éter (9:1)	Matraz B
- 3°	100 ml hexano-éter (8:2)	Matraz C
- 4°	100 ml hexano-éter (7:3)	Matraz D
- 5°	100 ml hexano-éter (1:1)	Tubos del 1 al 4
- 6°	200 ml hexano-éter (3:7)	Tubos del 4 al 11
- 7°	200 ml éter	Tubos del 11 al 20
- 8°	200 ml éter-acetato de etilo (8:2)	Tubos del 20 al 25
- 9°	200 ml éter-acetato de etilo (1:1)	Tubos del 25 al 32
- 10°	200 ml éter-acetato de etilo (2:8)	Tubos del 32 al 39
- 11°	100 ml acetato de etilo	Tubos del 39 al 42
- 12°	200 ml metanol	Tubos del 42 al 52

Mientras que el matraz A contenía 200 ml de eluido, el resto de matraces contenía 100 ml. La capacidad de los tubos era de 30 ml.

La TLC (cromatografía en placa fina) de las fracciones obtenidas y su posterior visualización con luz UV permitió reunir las siguientes fracciones:

Reunión A	Matraz A
Reunión B	Matraz B
Reunión C	Matraz C
Reunión D	Matraz D
Reunión E	Tubos 11 a 17
Reunión F	Tubos 18 a 40
Reunión G	Tubos 41 a 50

La detección de actividad autoinductora en las distintas reuniones obtenidas después de la columna de LSC demostró la presencia de actividad en la reunión D, de la que se obtuvieron 214 mg de peso seco. Los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de dicha reunión corresponden con la estructura de ácido (Z)-9-octadecenoico (ácido oleico, peso molecular 282, Figura 4.22).

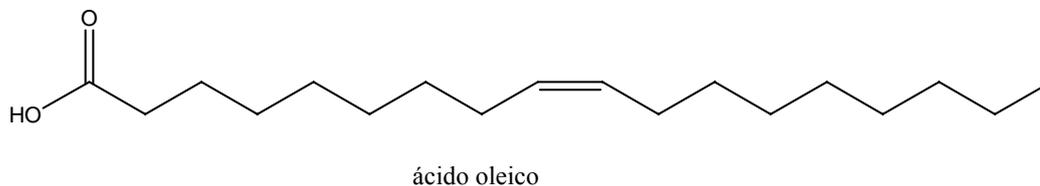


Figura 4.22. Estructura química del ácido graso (Z)-9-octadecenoico (ácido oleico).

Debido a la existencia de actividad autoinductora en las reuniones E, F y G, se llevaron a cabo los correspondientes espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$. Puesto que tales espectros mostraron la presencia de impurezas además de los compuestos mayoritarios, se procedió a su posterior purificación mediante HPLC. Previo a la cromatografía, el espectro UV de absorción del extracto del sobrenadante de *B. japonicum* USDA110, determinado primero entre 200 y 750 nm de longitud de onda y, posteriormente, entre 240 y 260 nm, indicó que el máximo de absorción correspondía a 251 nm (Figura 4.23), longitud de onda que se incluyó junto con la de 200 nm, como parámetros de funcionamiento en el cromatógrafo.

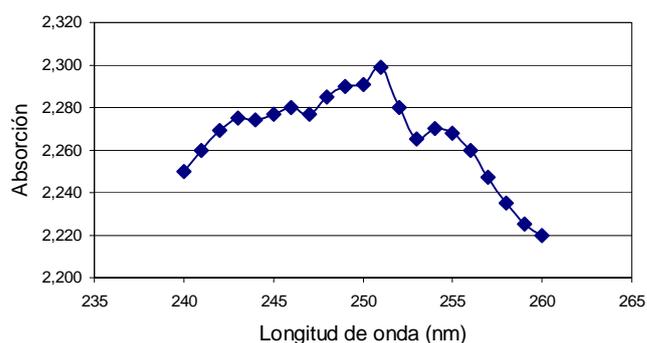


Figura 4.23. Espectro de UV de absorción del extracto del sobrenadante de *B. japonicum* USDA110. La muestra se preparó como una disolución de 25 mg en 2 ml de acetonitrilo adicionado de 25 gotas de cloruro de metileno. Se muestra el espectro entre 240 y 260 nm.

A pesar de las impurezas observadas en los cromatogramas de las reuniones E, F y G (Figura 4.24, A, B y C, respectivamente), el perfil de picos fue similar, por lo que se reagruparon de nuevo y se sometieron a una segunda separación mediante LCS.

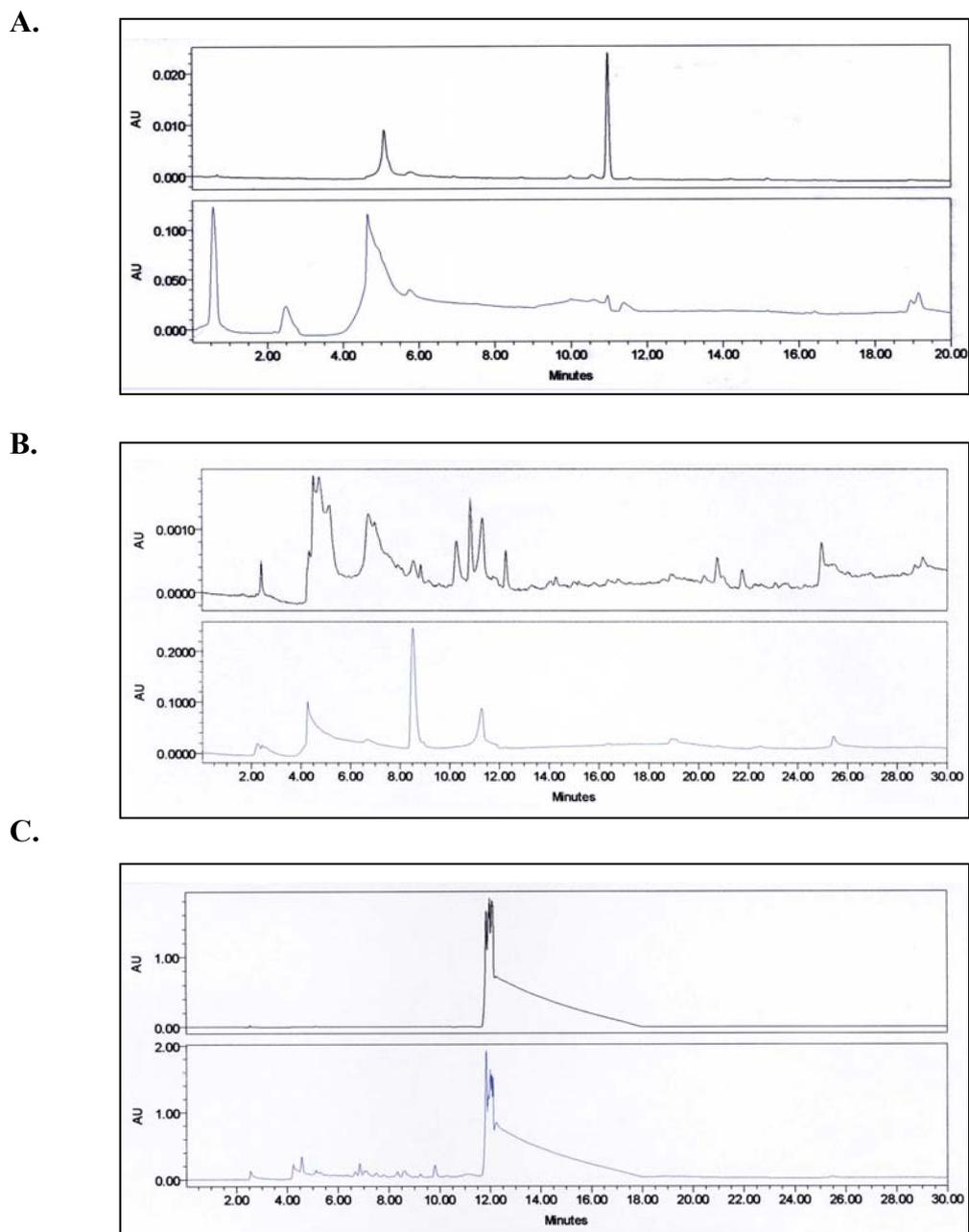


Figura 4.24. Cromatogramas de las reuniones E, F y G. Los paneles A, B y C muestran los cromatogramas de las fracciones E, F y G, respectivamente. Para el estudio de estas fracciones se utilizó una columna analítica. Como fase móvil se empleó una mezcla (v/v) de acetonitrilo:agua (0:100 en el minuto cero; 100:0 en el minuto 30) durante 30 minutos, a un flujo de 1 ml/minuto. En cada figura, el cromatograma superior corresponde a λ 251 y el inferior a λ 200 nm.

El eluato/eluido se recogió en cuatro reuniones, tubos 3 a 5, tubos 6 a 12, tubos 13 a 25 y tubos 26 a 40, que se denominaron fracciones, H (74 mg peso seco), I (24 mg peso seco), J (20 mg peso seco) y K (55 mg peso seco). Todas las fracciones mostraron actividad autoinductora (no se muestran los resultados).

4.4.2. Purificación por cromatografía líquida de alta presión de la fracción H

El cromatograma de la fracción H (Figura 4.25) mostró la presencia de varios picos, de los cuales el correspondiente al tiempo de retención 10 min 58 seg, cuyo compuesto asociado se ha denominado compuesto 2 (C2), fue el único que presentó actividad autoinductora en el bioensayo reverso con *C. violaceum* CV026. El peso seco de C2 fue de 5 mg.

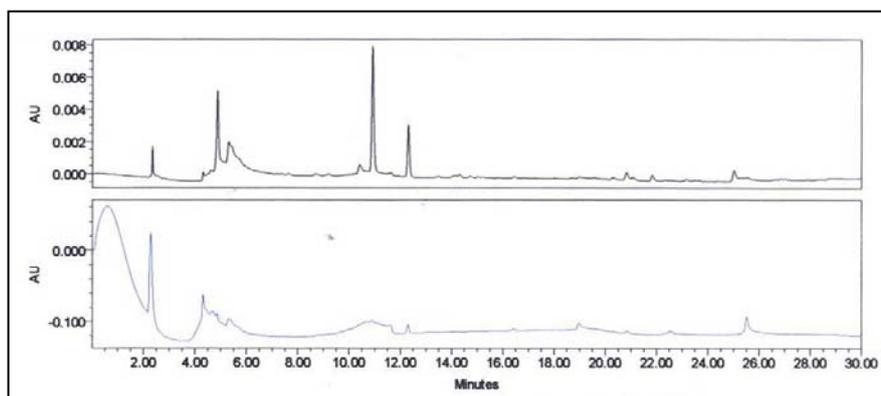


Figura 4.25. Cromatograma de la fracción H. Para la separación se utilizó una columna semipreparativa. Como fase móvil se empleó una mezcla (v/v) de acetonitrilo:agua (0:100 en el minuto cero; 100:0 en el minuto 30) durante 60 minutos a un flujo de 1 ml/minuto. En cada figura, el cromatograma superior corresponde a λ 251 y el inferior a λ 200 nm.

4.4.3. Estructura del compuesto C2

4.4.3.1. Espectrometría de masas de baja resolución (EMBR) y resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{HRMN}$)

El espectro de masas de baja resolución de C2 presentó un pico a m/z 337 [$\text{M}^+ - \text{NH}_2$], lo que indica que su masa molecular es de 353 unidades de masa. El espectro de protones de C2 mostró señales a δ 8.19, 8.18, 7.65, 6.24, 5.16, 4.14, 3.82, 3.61 ppm (Figura 4.26). La integración de este espectro, aplicando como referencia 2 protones

para la señal a 8.19 ppm dio una relación de protones para las diversas señales de 2:1:2:1:1:1:3, lo que indica la existencia de un mínimo de 12 protones no intercambiables.

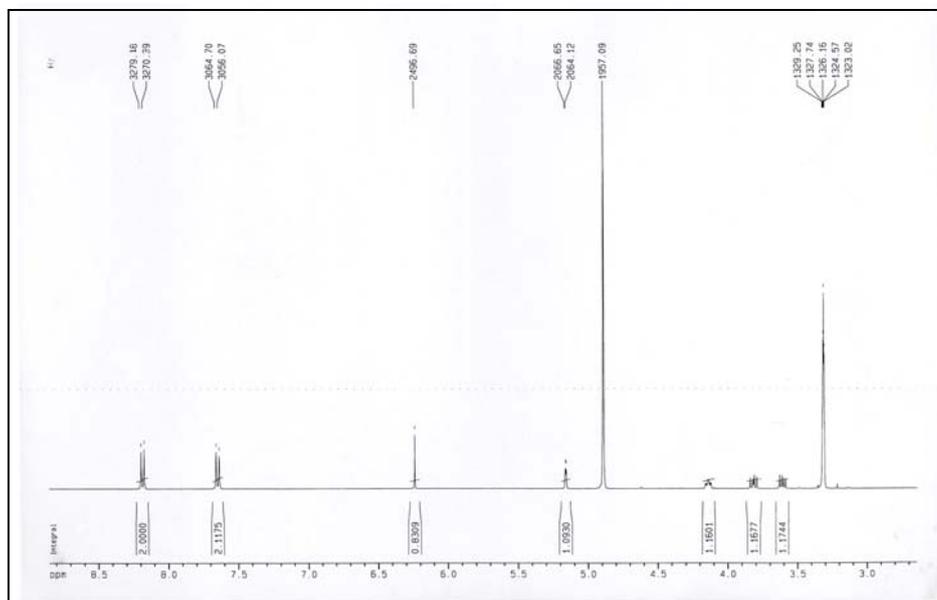


Figura 4.26. Espectro de protones de C2. El espectro de protones se realizó en metanol deuterado. La ampliación del espectro de protones de C2 se muestra en el Anexo 2.

Las señales a 8.19 y 7.65, ambas dobletes con una constante de acoplamiento $J = 8.7$ Hz, indican la presencia de anillos aromáticos sustituidos en posición *para*. A 8.18 ppm aparece una señal doblete, solapada por la mencionada anteriormente a 8.19 ppm, con una $J = 7.0$ Hz, correspondiente probablemente a un hidrogeno unido a un grupo carbonilo. A un desplazamiento químico de 6.24 ppm encontramos una señal singlete, que integra por un átomo de hidrogeno, debida a un hidrógeno unido sobre un carbono que a su vez se encuentra unido a varios grupos desapantallantes. La señal a 5.16 ppm, doblete con constante de acoplamiento $J = 2.7$ Hz, corresponde a un átomo de hidrógeno situado sobre un átomo de carbono en posición bencílica unido a un heteroátomo, probablemente oxígeno, sugerencia que se justifica al observar las señales situadas a 3.82, doblete con constantes de acoplamiento $J = 10.9, 7.2$ Hz, y 3.61 ppm (dobledebe con constantes de acoplamiento $J = 10.9, 6.1$ Hz, correspondientes a sendos protones diasterotópicos (no equivalentes) situados sobre un átomo de carbono unido a un átomo de oxígeno. Ambos protones estan acoplados entre si, con una constante de acoplamiento $J = 10.9$ Hz, y con el protón cuya señal aparece a 4.14 ppm, dobledebe con constantes de acoplamiento $J = 7.2, 6.1, 2.7$ Hz, como se

desprende del valor de las constantes de acoplamiento, 7.2 y 6.1 Hz, que presenta esta señal. A su vez, esta última señal presenta una tercera constante de acoplamiento de 2.7 Hz, que nos indica que el protón al que corresponde esta señal también se encuentra acoplado al protón cuya señal aparece a 5.16 ppm. Este protón está unido a un átomo de carbono que también se encuentra unido a un heteroátomo, nitrógeno en este caso. De este conjunto de señales se deduce que C2 presenta una agrupación como la que se muestra en la figura 4.27, que es la única posibilidad para que encajen las señales indicadas.

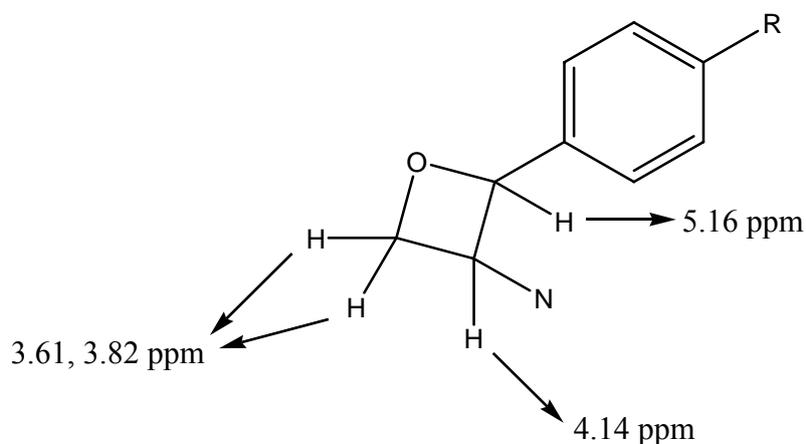


Figura 4.27. Posición de hidrógenos sobre el grupo aminooxetano del compuesto C2. Se muestra de forma esquemática la posición de los hidrógenos del grupo aminooxetano a partir de las señales detectadas en los espectros de $^1\text{HRMN}$.

Estos resultados, junto el valor del peso molecular de C2, sugieren la existencia de dos sistemas aromáticos en la molécula, y justifican la simetría molecular de C2, la cual se pone de manifiesto al aparecer menor número de protones en el espectro que el necesario para completar la masa molecular del compuesto.

4.4.3.2. Resonancia magnética nuclear de carbono 13 ($^{13}\text{CRMN}$)

El espectro de carbono 13 de C2 (Figura 4.28) presentó un total de 9 señales a δ 166.57, 151.65, 148.63, 128.34, 124.15, 71.29, 67.37, 62.22, 58.51. Puesto que la intensidad de las señales situadas a 128.34, 124.15 es el doble que para el resto, los datos sugieren que tales señales corresponden a un número mayor de átomos de carbono que el de las señales restantes. Se tendría así un posible número de 11 átomos de

carbono que, debido a la simetría de C2, sería, realmente, 20-22 átomos de carbono. La señal a 166.57 ppm corresponde a un átomo de carbono cuaternario (no unido a ningún átomo de hidrógeno, C) de tipo carbonílico. Las señales a 151.65, 148.63, 128.34 y 124.15 ppm son típicas de anillos aromáticos, siendo las dos primeras, 151.65 y 148.63 ppm, correspondientes a carbonos cuaternarios y las dos siguientes, 128.34 y 124.15 ppm, a carbonos primarios (unidos un átomo de hidrógeno, CH). Estas señales indican que C2 presenta anillos aromáticos disustituídos, lo que ya se indicó en el análisis del espectro de protones, y que dicha sustitución es en posición *para*. A 71.29 ppm aparece la señal correspondiente a un átomo de carbono primario unido a heteroátomo, oxígeno o nitrógeno, y que se ha asignado como el átomo de carbono que se encuentra unido al anillo aromático y a un átomo de oxígeno del anillo de oxetano. Se descarta que la señal a 71.29 ppm correspondiera al átomo de carbono unido a los grupos amino debido a que el desplazamiento químico habitual para una señal de ese tipo es menor. A 67.37 encontramos una señal que corresponde a un átomo de carbono primario, unido a algún tipo de heteroátomo y/o otros grupos desapantallantes. A 62.21 ppm aparece una señal correspondiente a un carbono secundario (unido a dos protones, CH₂), unido también a un heteroátomo, en este caso, el átomo de oxígeno del anillo de oxetano. A 58.51 ppm se encuentra un carbono primario, unido heteroátomo a NH₂ en este caso. Estas señales están de acuerdo con la subestructura propuesta para esta molécula en la figura 4.27.

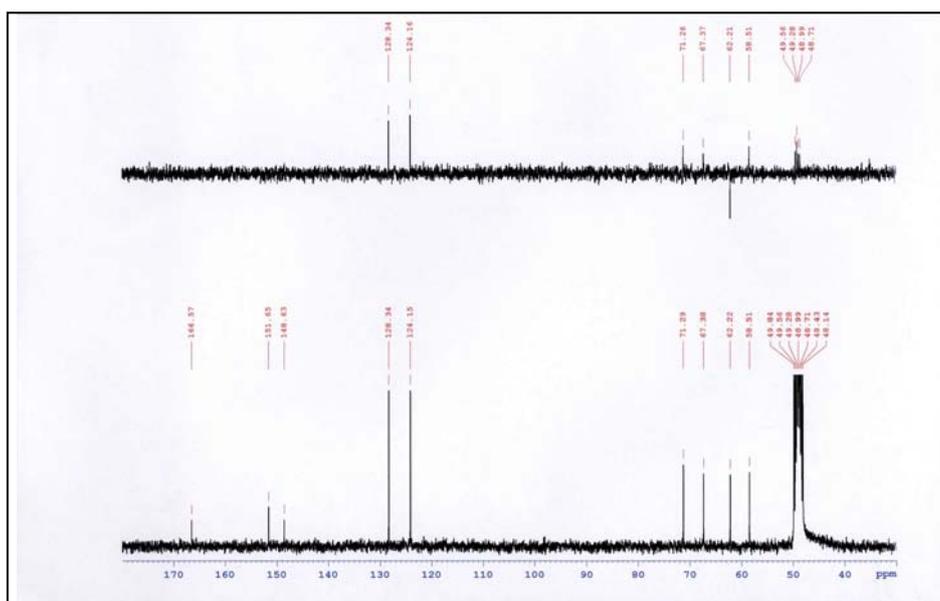


Figura 4.28. Espectro de carbonos de C2. Dicho espectro se realizó en metanol deuterado.

4.4.3.3. Resonancia magnética nuclear de correlación protón-carbono (Experiencia HMQC)

Para comprobar la correspondencia entre las señales debidas a los espectros de protones y de carbono, se llevó a cabo una experiencia de HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) de C2 (Figura 4.29). Los resultados indican que todas las señales correlacionaron entre sí, lo que confirma la asignación de las señales de RMN de protones y carbono 13 indicada en los apartados anteriores. Al no tener protones asociados, no se detectan las resonancias de los carbonos C-4-9 y C-4'-9'.

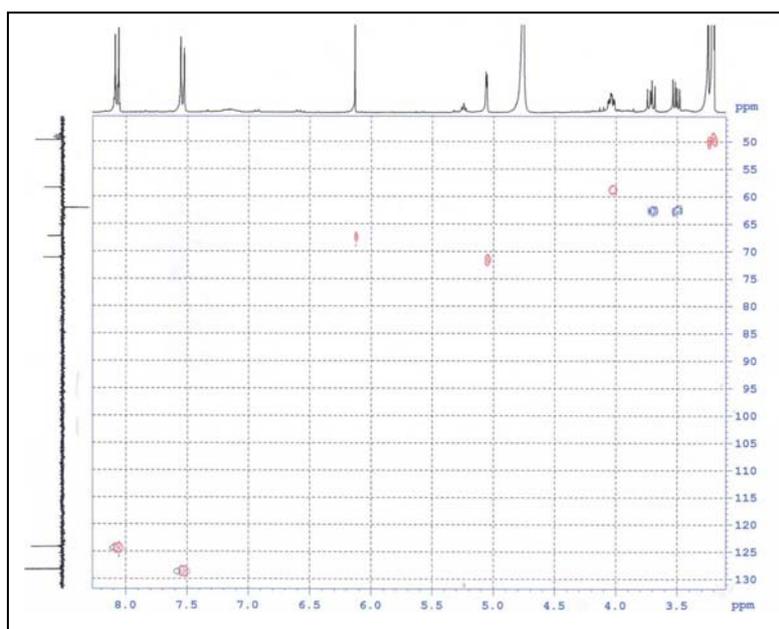


Figura 4.29. Espectro de HMQC de C2. El espectro muestra las correlaciones entre los protones y los carbonos a los que están directamente unidos. Solamente existe interacción entre los protones y carbonos en los que aparece señal de correlación. La ampliación del espectro de HMQC de C2 se muestra en el Anexo 3.

De acuerdo con los datos anteriores, el compuesto C2 se ha identificado como Bradioxetina 2, cuya estructura se propone en la Figura 4.30.

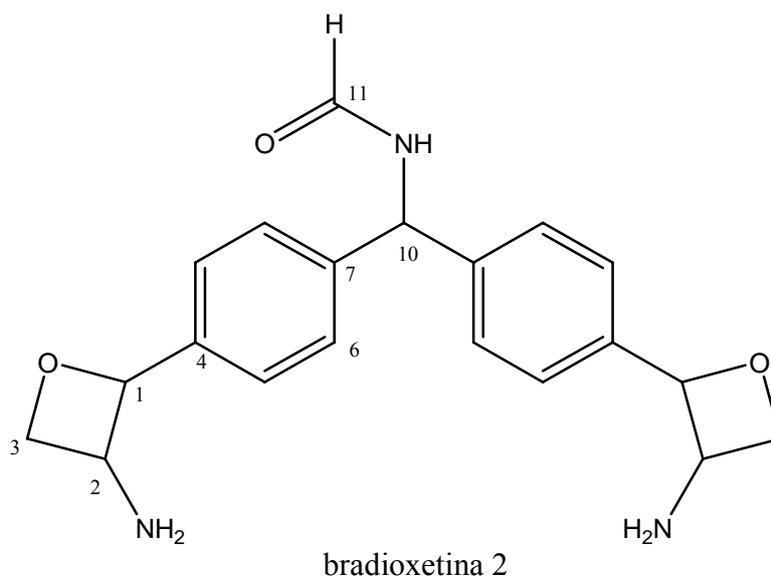


Figura 4.30. Estructura de la Bradioxetina 2. La nueva estructura propuesta, cuya fórmula molecular ha sido confirmada mediante espectrometría de masas, presenta un grupo formilo unido al grupo imino del esqueleto de Bradyoxetina.

4.4.4. Purificación a partir de la fracción I y J

El estudio de los espectros de RMN de protones y de carbono 13 de las fracciones I y J coincidían con los obtenidos para la fracción H, tratándose de la misma molécula algo impurificada.

4.4.5. Purificación a partir de la fracción K.

El estudio de los espectros de protones y de carbono 13 de la fracción K mostró la existencia de al menos dos compuestos con un esqueleto similar. Por ello, procedimos a realizar la purificación por HPLC de esta fracción. El cromatograma de la fracción K (Figura 4.31) mostró la presencia de varios picos, de los cuales el correspondiente a un tiempo de retención de 33,8 minutos, cuyo compuesto asociado se ha denominado compuesto 3 (C3), fue el único que presentó actividad autoinductora en el bioensayo reverso con *C. violaceum* CV026. El peso seco de C3 fue de 2 mg.

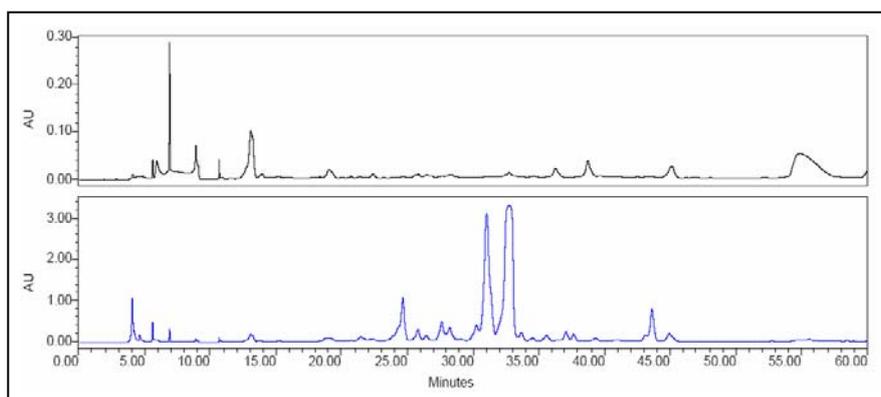


Figura 4.31 Cromatograma de la fracción K. Para la separación se utilizó una columna semipreparativa. Como fase móvil se empleó una mezcla (v/v) de acetonitrilo:agua (0:50 en el minuto cero; 50:0 en el minuto 30) durante 60 minutos a un flujo de 1 ml/minuto. El cromatograma superior corresponde a λ 251 y el inferior a λ 200 nm.

4.4.6. Estructura del compuesto C3

4.4.6.1. Espectrometría de masas de baja resolución (EMBR) y resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{HRMN}$)

El espectro de masas de baja resolución de C3 presentó un ión molecular a m/z 228, lo que indica que su masa molecular es de 228 unidades de masa. El espectro de protones de C3 mostró señales a δ 4.12, 4.02, 3.56, 2.36, 2.15, 2.07, 2.01, 1.91, 1.72, 1.55, 1.00 y 0.96 ppm (Figura 4.32). La integración de este espectro, aplicando como referencia 1 protón para la señal a 4.12 ppm dio una relación de protones para las diversas señales de 1:1:1:2:1:1:1:1:1:1:3:3, lo que indica la existencia de un mínimo de 18 protones no intercambiables.

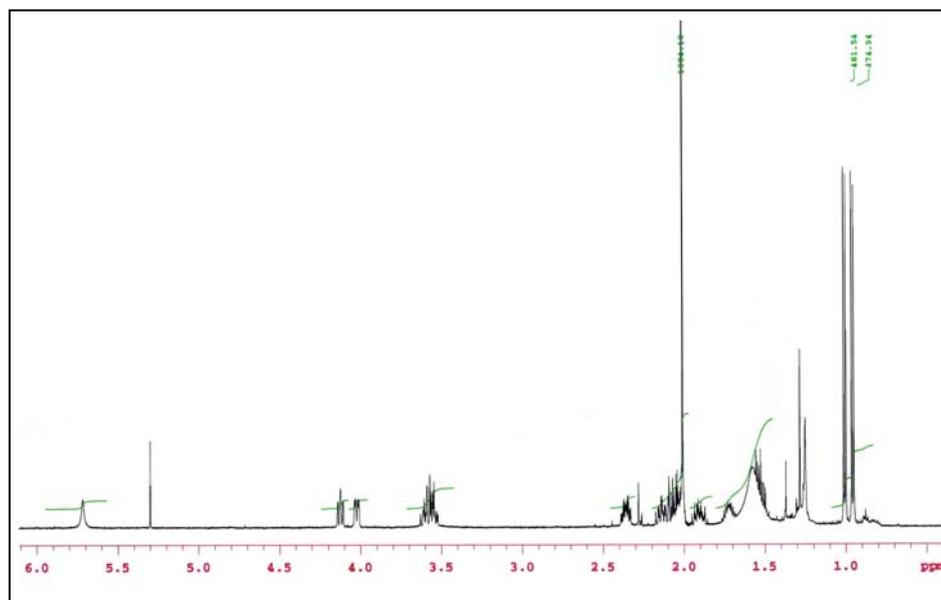


Figura 4.32. Espectro de protones de C3. El espectro de protones se realizó en cloroformo deuterado. La ampliación del espectro de protones de C3 se muestra en el Anexo 4.

A 5.71 ppm aparece una señal singlete ancho, que integra por 1, correspondiente a un hidrógeno unido a un átomo de nitrógeno (agrupación NH). La señal a 4.12 ppm, triplete con una constante de acoplamiento $J = 8.0$ Hz y que integra por 1, corresponde a un átomo de hidrógeno acoplado a otros 2 hidrógenos. El alto desplazamiento químico de esta señal nos indica que este hidrógeno se encuentra sobre un átomo de carbono unido a su vez a un heteroátomo. A 4.02 ppm encontramos una señal, doble doblete con constantes de acoplamiento $J = 9.7, 3.8$ Hz y con integral igual a 1, que corresponde a un átomo de hidrógeno situado sobre un átomo de carbono unido a un heteroátomo, probablemente oxígeno, y que se acopla a otros dos átomos de hidrógeno no equivalentes. A un desplazamiento químico de 3.56 ppm aparece una señal multiplete, que integra por dos átomos de hidrógeno, situados sobre un átomo de carbono unido a un heteroátomo o en posición α de un grupo lactona o lactama. A 2.36 ppm aparece una nueva señal multiplete que integra por 1 átomo de hidrógeno, correspondiente a un hidrógeno colocado sobre un átomo de carbono cercano a algún grupo desapantallante. Entre 2.17 ppm y 2.00 ppm aparece un conjunto de 3 señales, todas ellas multiplete, integrando cada una de ellas por 1 átomo de hidrógeno, de las que *a priori* no se puede obtener más información. La señal a 1.91 ppm también corresponde a un multiplete que integra por 1 hidrógeno, mientras que a 1.72 ppm encontramos una señal, nonanete con $J = 6.7$ Hz y que integra por un átomo de

hidrógeno, correspondiente a un hidrógeno que debe estar acoplado a otros 8 átomos de hidrógeno. Finalmente, a un desplazamiento químico de 1.00 y 0.96 ppm encontramos sendos dobletes, con $J = 6.7$ Hz, integrando cada uno de ellos por 3 átomos de hidrogeno, por lo que corresponden a dos grupos metilo (CH_3) acoplados a un átomo de hidrógeno (que por el valor de la constante de acoplamiento debe ser el que aparece a 1.72 ppm). La información contenida en este espectro de protones, sin embargo, no es suficiente para poder proponer una posible estructura del compuesto, por lo que se realizaron experiencias adicionales de RMN, como indicamos a continuación.

4.4.6.2. Resonancia magnética nuclear de carbono 13 ($^{13}\text{CRMN}$)

El espectro de carbono 13 del compuesto C3 (Figura 4.33) presentó un total de 11 señales a δ 170.27, 166.32, 59.22, 53.59, 45.75, 38.86, 28.36, 24.98, 23.54, 22.98 y 21.39 ppm. Las señales a 170.27 y 166.32 ppm corresponden a sendos átomos de carbono cuaternarios (no unidos a ningún átomo de hidrógeno, C) de tipo carbonílico. Por su desplazamiento químico, estas señales pueden corresponder a un grupo éster (RCOOR') o a un grupo de tipo amida (RCONHR'). Las señales a 59.22 y 53.59 corresponden a carbonos primarios (unidos a un átomo de hidrógeno, CH) que están unidos a heteroátomo. A 45.75 ppm aparece la señal correspondiente a un átomo de carbono secundario (unido a dos átomos de hidrógeno, CH_2) que por su desplazamiento químico puede estar unido a un halógeno (probablemente Cl) o bien a un heteroátomo de una agrupación éster o amida. A 38.87 y 28.36 ppm aparecen sendas señales correspondientes a carbonos secundarios (unidos a dos protones, CH_2), que por su desplazamiento químico deben estar incluidos en el seno de una cadena hidrocarbonada. A 24.98 ppm se encuentra un carbono primario, que por el bajo desplazamiento químico al que se encuentra debe formar parte de una cadena hidrocarbonada. Este desplazamiento químico es típico de una agrupación de tipo isopropilo.

A un desplazamiento químico de 22.98 ppm encontramos la señal correspondiente a un carbono secundario integrado en el seno de una cadena hidrocarbonada. Finalmente, a 23.54 y 21.38 ppm observamos dos señales correspondientes a carbonos terciarios (unidos a tres átomos de hidrógeno, CH_3) que nos confirman la existencia del grupo isopropilo indicado anteriormente.

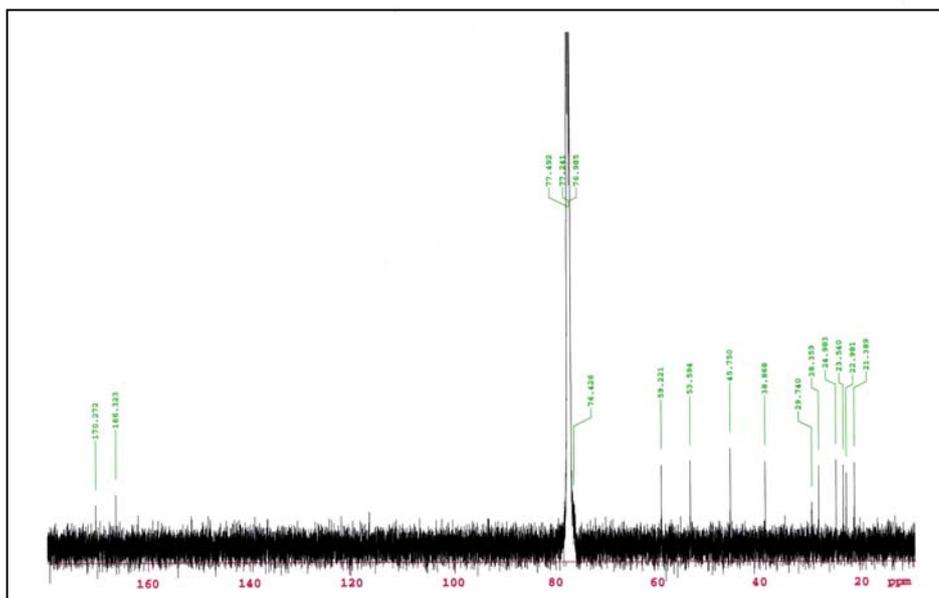


Figura 4.33. Espectro de carbonos de C3. Dicho espectro se realizó en cloroformo deuterado.

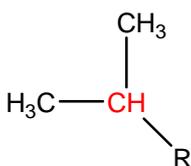


Figura 4.34. Agrupación isopropilo.

4.4.6.3. Resonancia magnética nuclear de correlación protón-carbono (Experiencia HMQC)

Para comprobar la correspondencia entre las señales debidas a los espectros de protones y de carbono, se llevó a cabo una experiencia de HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) de C3 (Figura 4.35). Se observa que todas las señales del espectro de RMN de protones tienen su correspondiente en el de carbono 13. La señal a 4.12 ppm correlaciona con la situada a 59.22 ppm, confirmando que se trata de un grupo CH unido a un heteroátomo. De igual forma, la señal que aparece a 4.02 en el espectro de protones corresponde a la señal a 53.59 del espectro de carbono 13, indicándonos que se trata de un grupo CH unido también a un heteroátomo. La señal a 3.56 ppm correlaciona con la que aparece a 45.75 ppm en el espectro de carbono 13, lo que nos confirma que se trata de un grupo CH₂, que por su desplazamiento químico debe

estar unido a un heteroátomo presente en un grupo éster o amida. Por su parte, las señales colocadas a 2.35 y 2.15 ppm correlacionan con la señal que aparece a 28.35 ppm en el espectro de carbono 13, lo que nos indica que ambos protones forman parte del mismo grupo CH_2 . Lo mismo ocurre con las señales situadas a 2.07 y 1.55 ppm, que correlacionan con la señal a 38.87 ppm, señal que corresponde a un grupo CH_2 . La gran diferencia de desplazamiento químico de estas señales de protones se puede deber a que por cuestiones geométricas, el protón a 2.07 ppm quede más cercano en el espacio a un grupo carbonilo o heteroátomo, siendo desapantallada. De forma idéntica a los dos anteriores casos, las señales situadas a 2.01 y 1.91 ppm corresponden al grupo CH_2 cuya señal aparece a 22.98 ppm en el espectro de carbono 13.

En esta experiencia podemos confirmar también la existencia del grupo isopropilo anteriormente propuesto, al observarse que las señales situadas a 1.72, 1.00 y 0.96 ppm correlacionan respectivamente con las señales a 24.98 (CH), 23.54 (CH_3) y 21.38 (CH_3).

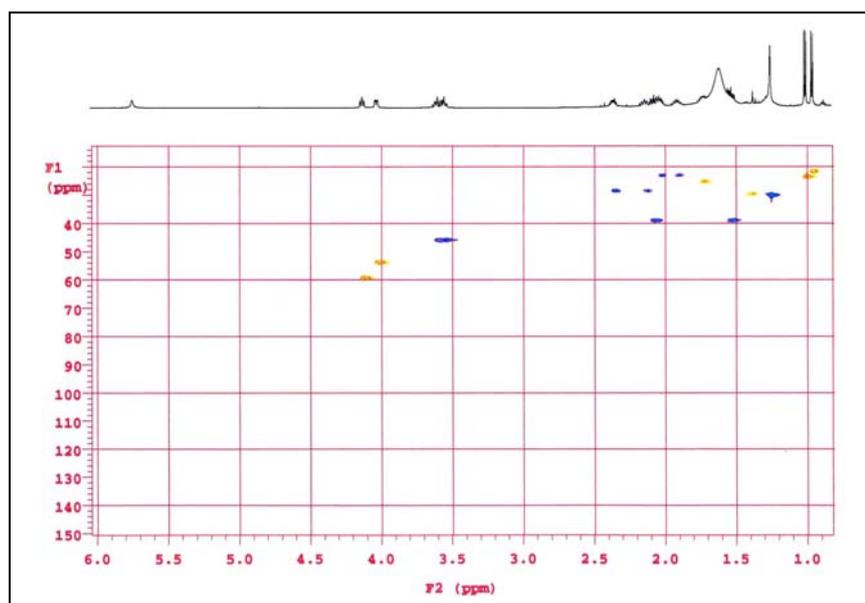


Figura 4.35. Espectro de HMQC de C3. El espectro muestra las correlaciones entre los protones y los carbonos a los que están directamente unidos. Solamente existe interacción entre los protones y carbonos en los que aparece señal de correlación. La ampliación del espectro de HMQC de C3 se muestra en el Anexo 5.

4.4.6.4. Resonancia magnética nuclear de correlación protón-protón (Experiencia COSY)

Para comprobar el acoplamiento entre las señales debidas a los protones presentes en esta molecula, y por tanto, conocer que átomos de hidrógeno se encuentran en posiciones vecinales, se llevó a cabo una experiencia de COSY (Correlated Spectroscopy) de C3 (Figura 4.36). En esta experiencia hemos obtenido los siguientes datos:

- La señal a 4.12 ppm correlaciona con las señales a 2.35 y 2.15 ppm. Como hemos indicado anteriormente, estas señales a 2.35 y 2.15 ppm corresponden a un grupo CH₂, por lo que de esto deducimos que el grupo CH al que corresponde la señal a 4.12 ppm es un triplete por su acoplamiento con estos dos protones, y que su desplazamiento químico es debido a la presencia de un heteroátomo sobre el átomo de carbono en el que se encuentra.
- La señal a 4.02 ppm presenta correlación con las señales a 2.07 y 1.55 ppm (señales que corresponden a los protones de un grupo CH₂), lo que nos confirma la multiplicidad de la señal a 4.02 ppm, además de indicarnos que estos protones son vecinales, y por tanto sus átomos de carbono asociados están unidos en la cadena carbonada.
- La señal situada a 3.56 ppm correlaciona únicamente con las señales a 2.01 y 1.91 ppm (que también corresponde a un mismo grupo CH₂). Ello no explica totalmente la complejidad que presenta dicha señal, por lo que probablemente estos dos protones también están acoplados otros protones con los que no existe correlación en esta experiencia (como ocurre en el caso de protones que formen un ángulo diedro entre si de 0° o 90°). Este dato es importante porque nos indica que el grupo CH₂ al que corresponde la señal a 3.56 ppm no forma parte de una cadena hidrocarbonada, si no que probablemente se encuentra localizado en una estructura ciclica.

- Las señales situadas a 2.35 y 2.15 ppm, además de la anteriormente mencionada correlación con la situada a 4.12 ppm, presenta la esperada correlación entre ellas mismas, como corresponde a átomos de hidrógeno geminales (colocados sobre el mismo átomo de carbono). Sin embargo, la complejidad de ambas señales es mucho mayor, lo que nos indica nuevamente que se encuentran acoplados a un mayor número de átomos de hidrogeno (al menos 2 más), indicándonos que este grupo CH₂ debe formar parte de una estructura de tipo ciclico.
- La señal situada a 2.07 ppm presenta correlación con su proton geminal (señal a 1.5 ppm) y con la señal situada a 1.72 ppm (correspondiente al CH del grupo isopropilo), por lo que ello nos indica que el grupo CH₂ al que corresponden estos protones estan unidos al CH del grupo isopropilo (justificando la multiplicidad de la señal a 1.72 ppm).
- La señal situada a 2.01 ppm solamente muestra correlación con la situada a 1.91 ppm, su protón geminal, además de la correlación anteriormente indicada con la señal a 3.56 ppm. Nuevamente observamos que la complejidad de esta señal es mayor que la debida al acomplamiento con el número de protones indicado, lo que nos lleva a sospechar que también se trata de un grupo CH₂ incluido en el seno de una estructura de tipo cíclico.
- Finalmente, se observa que la señal a 1.72 ppm, además del indicado acomplamiento con la situada a 2.07 ppm, también se acopla como era previsible con las señales a 1.00 y 0.96 ppm, correspondientes a sendos grupos metilo (CH₃), correspondientes al grupo isopropilo.

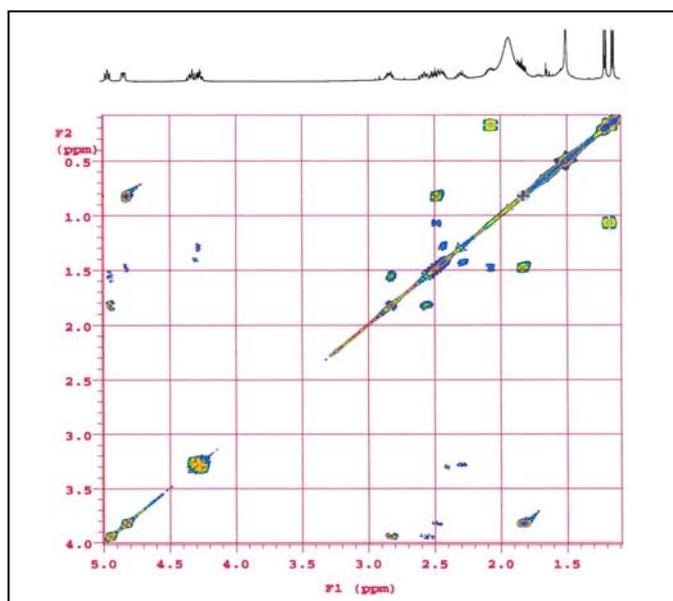


Figura 4.36. Espectro de COSY de C3. El espectro muestra las correlaciones entre protones que se encuentran sobre carbonos vecinales. Solamente existe interacción entre los protones en los que aparece señal de correlación. La ampliación del espectro de COSY de C3 se muestra en el Anexo 6.

De acuerdo con los datos anteriores, el compuesto C3 se ha identificado como 2-amino-4-metil-N-(2-oxo-tetrahidro-2H-piran-3-il)pentanamida, cuya estructura se propone en la Figura 37.

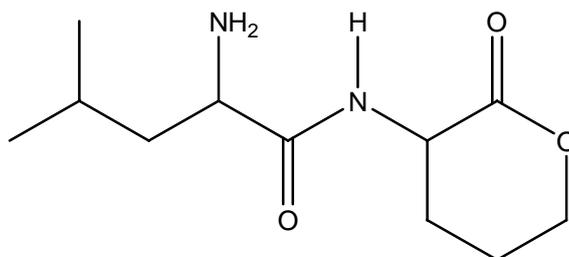


Figura 37. Estructura de la 2-amino-4-metil-N-(2-oxo-tetrahidro-2H-piran-3-il)pentanamida. La nueva estructura propuesta, cuya fórmula molecular ha sido confirmada mediante espectrometría de masas de baja resolución.

5. DISCUSIÓN

El sistema de regulación por quórum-sensing se caracterizó por primera vez en las bacterias *V. fischeri* y *V. harveyi*. Dichas bacterias colonizan órganos especializados en la producción de bioluminiscencia de determinadas especies de peces y calamares con los que establecen simbiosis (Pearson et al. 1994). Desde ese momento hasta la actualidad se han descrito un número creciente de sistemas de regulación por QS tanto en bacterias gram-negativas (Fuqua et al. 2001; Fuqua y Greenberg, 2002) y gram-positivas (Miller y Bassler et al. 2001), como en simbioses beneficiosas (González y Marketon, 2003) y patógenas de plantas y animales (Von Bodman et al. 2003; Pemberton et al. 2004). La presencia de los sistemas de regulación por QS en tal cantidad y diversidad de organismos podría deberse a que se trata de un mecanismo que permite a estos microorganismos coordinar su comportamiento para adaptarse a los cambios continuos que se producen en el medio.

Los tres grandes mecanismos de QS descritos hasta el momento requieren la existencia de un regulador transcripcional y una molécula autoinductora difusible y permeable a través de la membrana celular. Los sistemas LuxR/LuxI (Pearson et al. 1994) y LuxM/AI-1 (Fuqua et al. 2001) son característicos de bacterias gram-negativas, mientras que péptidos (Miller y Bassler et al. 2001), de pequeño tamaño que interaccionan con sistemas de dos componentes están implicados en la regulación de la transcripción de genes específicos en bacterias gram-positivas. Por último, el sistema LuxS/AI-2 se ha identificado tanto en bacterias gram-negativas como gram-positivas (Shiner et al. 2005).

En bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* se ha demostrado que los mecanismos de QS en los que intervienen un regulador transcripcional y una sintasa de la familia LuxR/I están implicados en el control de fenómenos relacionados con la simbiosis que establece la bacteria con la planta hospedadora (González y Marketon, 2003). Los principales procesos de dicha simbiosis controlados por QS son la adhesión y colonización de la raíz, activación de los genes *nod*, eficiencia de la nodulación, desarrollo del simbiosoma y fijación de nitrógeno.

Bradyrhizobium japonicum USDA110 es una bacteria del género *Bradyrhizobium* capaz de establecer asociaciones simbióticas con plantas leguminosas, principalmente soja (*Glycine max*). Estudios previos realizados en el grupo del Prof. D. Eulogio Bédmar Gómez del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada) permitieron detectar la presencia de señal de autoinducción en el sobrenadante de cultivos

bacterianos de dicha cepa con una DO_{600} de entre 0,6-0,7 crecidos durante 10 días. Para detectar la presencia de autoinductores en el sobrenadante bacteriano de *B. japonicum* USDA110 se empleó el bioensayo realizado con la cepa bioindicadora *Chromobacterium violaceum* CV026, mutada en el gen *cviI* incapaz de producir el pigmento violaceína (McClellan et al. 1997). *C.violaceum* CV026 es capaz de recuperar la capacidad de sintetizar violaceína en presencia de AHLs de cadena corta (C4 a C8). AHLs de cadena larga (C10 a C14) también pueden detectarse empleando este bioindicador porque son capaces de inhibir la producción de violaceína cuando se ha adicionado al medio de cultivo una AHL comercial.

La presencia de actividad autoinductora en los sobrenadantes de *B. japonicum* USDA110 se comprobó de las dos formas descritas (Brelles-Mariño y Bedmar, 2001). El resultado de ensayo sin AHL exógena fue negativo, lo cual sugiere que *B. japonicum* USDA110 no produce AHLs de cadena corta. Sin embargo este resultado no puede darse por definitivo porque la ausencia de señal de autoinducción podría deberse a una falta de sensibilidad de la cepa bioindicadora o una concentración insuficiente de AHLs de cadena corta para ser detectada. Por otro lado se comprobó la capacidad de inhibir la producción de violaceína en presencia de una AHL exógena. El resultado positivo sugirió que *B. japonicum* USDA110 era una bacteria capaz de producir moléculas autoinductoras de la familia de las AHL con cadenas carbonadas de más de 8 átomos de carbono.

La cuantificación del número de autoinductores previamente detectados en placa petri se realizó mediante TLC revelada con bioensayo reverso. La separación del extracto de sobrenadante bacteriano preparado en diclorometano y su posterior revelado mostró una única señal de actividad, posiblemente relacionada con una única molécula autoinductora (Brelles-Mariño y Bedmar, 2001).

La detección de una molécula con actividad autoinductora en el sobrenadante de *B. japonicum* USDA110 en el laboratorio de del Prof. D. Eulogio Bédmar Gómez coincide con los resultados obtenidos por Stacey y colaboradores, quienes demostraron la existencia de un compuesto, detectado mediante HPLC, que se acumula conforme aumenta la densidad celular de la población (Loh et al. 2001). Dicho compuesto se purificó empleando técnicas químicas de análisis y de elucidación de estructuras concluyendo que se trataba de una molécula diferente a la cualquier otro autoinductor descrito hasta la fecha. A este compuesto se le ha denominado bradyoxetina y su estructura molecular propuesta fue 2-{4-[[4-(3-aminooxetano-2-il)fenil]-

(imino)metil]fenil}oxetano-3-ilamina (Loh et al. 2002). Se ha demostrado una posible implicación de este compuesto en la regulación de los genes de la nodulación (Loh y Stacey 2001; Loh et al 2002)

5.1. Genes *luxRI* de *B. japonicum*

A pesar de la existencia de evidencias de la síntesis de autoinductores por *B. japonicum* USDA110 (Brelles-Mariño, 2001; Loh et al 2002), aún no se ha identificado ningún gen implicado en dicha síntesis. La secuenciación del genoma completo de *B. japonicum* USDA110 (Kaneko et al. 2002) ha permitido identificar hasta 16 genes que codifican proteínas reguladoras de la transcripción de la familia LuxR. Sin embargo no se ha identificado ningún gen que codifique autoinductor sintasas de las familias *luxI*, *luxM*, *ainS* o *luxS* (Pongsilp et al. 2005).

La localización en el cromosoma de *B. japonicum* USDA110 del marco abierto de lectura *blr1063* respecto del ORF *blr1062*, con identidad de entre el 68% y el 27% con genes de la familia *luxR*, sugirió que *blr1062* podría ser un gen que codificara moléculas implicadas en la síntesis de autoinductores de la familia AHL. Los ORFs *blr1062* y *blr1063* se sitúan de manera semejante a los genes *cinRI* de *S. meliloti* Rm1021, *R. etli* CNPAF512 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* A34 (González y Marketon, 2003), y del mismo modo que sucede en el sistema RhiR/I de *R. leguminosarum* bv. *viciae* A34 podrían estar relacionados con una agrupación de genes localizados a continuación que se transcriben en el mismo sentido y que podrían constituir un operón que codifica un transportador de tipo ABC implicado en la difusión del autoinductor. Puesto que los ORFs *blr1062* y *blr1063* de *B. japonicum* USDA110 presentan homología con genes de la familia *luxRI*, pero se desconoce su función, se les ha denominado en este trabajo genes *luxR* y *luxI*, respectivamente.

Los genes *luxRI* de *B. japonicum* USDA110 podrían transcribirse de forma independiente, o por su semejante orientación, podrían comportarse como una única unidad transcripcional. A partir del análisis de la secuencia de ambos genes se identificaron dos probables secuencias Shine-Dalgarno de unión al ribosoma, lo que podría significar que estos genes se transcriben de manera independiente.

Los reguladores de la familia LuxR poseen en el N-terminal un dominio de unión a AHL que permite la oligomerización y activación de la proteína (Choi et al.

1992). El dominio de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice que se localiza en el C-terminal interviene en la regulación transcripcional de genes específicos facilitando la unión de la ARN polimerasa al promotor diana para activar la transcripción de dichos genes (Choi y Greenberg, 1992; Choi et al. 1992). Esta activación transcripcional requiere un elemento de ADN tipo *cis*-actina relacionado con la denominada caja *lux* (Devine et al. 1889; Gray et al. 1994). La proteína codificada por el gen *luxR* en *B. japonicum* USDA110 posee las dos regiones conservadas, el dominio de unión a AHL y el dominio de unión al ADN (Shadel et al. 1990; Slock et al. 1990), lo que parece confirmar que se trata de un regulador transcripcional de tipo LuxR implicado en fenómenos de QS. En la región anterior al sitio de inicio de la transcripción del gen *luxR* se ha identificado la secuencia TGT-N10-ACA que presenta un 100% de identidad con la secuencias consenso descrita como sitio de unión de la proteína NifA (Goffert et al. 2001). Dicha proteína regula la expresión de genes implicados en la fijación de nitrógeno en condiciones de bajo contenido de oxígeno (Sciotti et al. 2003). La presencia del sitio de unión a NifA sugiere la implicación de LuxR, en un escalón inferior a NifA, en la cascada de regulación de genes implicados en la fijación de nitrógeno por *B. japonicum* USDA110 en simbiosis con plantas leguminosas.

Las proteínas de la familia LuxI, de aproximadamente 200 aminoácidos, catalizan la ligación de SAM a una acil-ACP para formar la molécula de homoserina lactona y la cadena carbonada que dan lugar a una molécula autoinductora de la familia AHL (More et al. 1996; Schaefer et al. 1996; Fuqua et al. 2001). Estas proteínas presentan una serie de aminoácidos conservados de los cuales, los que se localizan en el extremo C-terminal pueden intervenir en la selección de la acil-ACP, mientras que la alteración de ciertos aminoácidos conservados en el extremo N-terminal parece provocar una pérdida o reducción de actividad sintasa (Hanzelka et al. 1997; Parsec et al. 1997). La proteína LuxI de *B. japonicum* USDA110 está compuesta por 223 aminoácidos y entre los aminoácidos 5 y 199 se localiza una región conservada con homología a LasI de *Pseudomonas aeruginosa* implicada en la producción de factores de virulencia (Pearson et al. 1995; Pesci e Iglewski, 1997). Por otro lado, en la secuencia de ADN de *luxI* se han identificado las secuencias GAT-N13-ATC y GG-N10-GC con un 100% de identidad con las secuencias consenso descritas como sitios de unión de las proteínas Fur (Friedman y O'Brian, 2003) y RpoN (Thompson et al. 2003; Heurlier et al. 2003), respectivamente. La presencia de la secuencia consenso para Fur sugiere que la expresión de *luxI* podría estar regulada en función de la concentración de

Fe³⁺ presente en el medio de cultivo. La identificación de esta secuencia podría estar relacionada con la regulación de *nolA* propuesta por Loh y colaboradores en la que la síntesis del factor de densidad celular bradyoxetina, que regula positivamente la expresión de *nolA*, depende negativamente del contenido en Fe³⁺ (Loh et al. 2002). La síntesis del factor de transcripción σ^{54} parece estar regulada por la proteína FixK₂ que está implicada en la regulación de genes que se expresan en condiciones de microaerobiosis y anaerobiosis. A su vez RpoN₁ regula la expresión de genes implicados en la fijación de nitrógeno junto a NifA. Por lo tanto, parece lógico que *luxI* dependiera de σ^{54} y NifA para su expresión en simbiosis. Se ha descrito que RpoN controla negativamente la expresión del gen *rhlI* de *Pseudomonas aeruginosa* que regula, mediante QS, la expresión de genes implicados en la síntesis de factores de virulencia (Heurlier et al. 2003; Thompson et al. 2003).

En la región intergénica de *luxRI* se ha identificado la existencia de la secuencia ACCT-N10-GCAG con un 100% de identidad con la caja *lux*, descrita como sitio de unión de las proteínas reguladoras de la familia LuxR (Egland y Greenberg, 1999; Pessi y Haas, 2000). La caja *lux* típica es una secuencia palindrómica de 18 pb a 22 pb, situada aproximadamente a 40 pb del sitio de inicio de la transcripción (Egland y Greenberg, 1999). La caja *lux* identificada en este trabajo se sitúa a -41 pb del sitio de inicio de la transcripción de *luxI*, lo que sugiere que LuxI intervendría, no sólo en la regulación de genes específicos dependientes de la densidad celular, sino que además podría estar implicada en su propia regulación a través de LuxR o depender de otros autoinductores producidos por *B. japonicum* USDA110 como sucede en las cascadas de regulación descritas en otros rizobios (González y Marketon, 2003).

5.2. Regulación de los genes *luxRI* de *B. japonicum*

5.2.1. Regulación en los fondos genéticos de las cepas USDA110 y 0852

El estudio de la regulación de los genes *luxRI* de *B. japonicum* se ha llevado a cabo a partir de ensayos de expresión realizados con las fusiones transcripcionales P_{*luxI*}-*lacZ* y P_{*luxR*}-*lacZ* en los fondos genéticos de las cepas parental, USDA110 y mutante *luxI*, 0852.

En condiciones aeróbicas la expresión de $P_{luxI-lacZ}$ resultó ser dependiente de la densidad celular en la cepa parental, lo que indica que la expresión *luxI* está regulada por QS y alcanza su máximo valor al principio de la fase estacionaria de cultivo. Sin embargo la cepa 0852 mantuvo una expresión basal cuyos valores se mantuvieron constantes y no superaron el 35% de expresión de la cepa parental. Todo lo anterior sugiere que el gen *luxI* se autoregula de la misma manera que lo hacen otros genes homologos implicados en colonización de la raíz, nodulación y fijación de nitrógeno, descritos en rizobios como *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (Cubo et al. 1992; Rodelas et al. 1999), *Rhizobium etli* CNPAF512 (Lightgow et al. 2000; Rosemeyer et al. 1998;), *Rhizobium etli* CFN42 (Tun-Garrido et al. 2003), *S. meliloti* Rm1021 (Marketon y González, 2002; Marketon et al. 2002). Siguiendo este tipo de regulación, los autoinductores sintetizados por LuxI facilitarían la unión de LuxR a la caja *lux* localizada en la región promotora de *luxI* para activar su transcripción (Wisniewski-Dyé et al. 2001). La expresión basal de *luxI* detectada en la cepa mutante se explicaría porque los genes de la familia *luxI* pueden presentar una expresión constitutiva no dependiente de la densidad celular (Von Bodman y Farrand, 1995). Además otros genes de la familia *luxI* regulados por QS en otros rizobios, después de ser mutados mantienen una expresión basal no dependiente de la densidad celular (Rodelas et al. 1999; Wisniewski-Dyé et al. 2001).

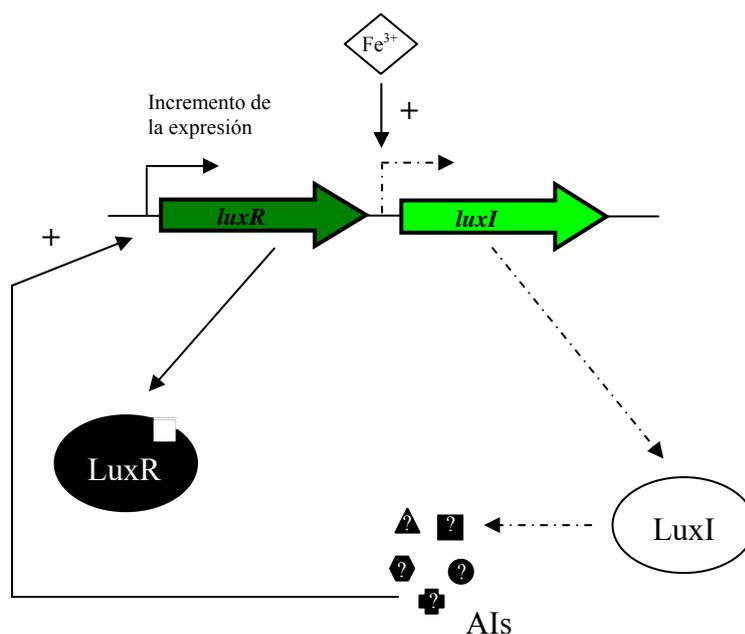
La existencia de la secuencia GAT-N13-ATC identificada como una posible caja Fur (Friedman y O'Brian, 2003) en la región promotora de *luxI* y anterior a la caja Lux sugirió que este gen podría depender de la concentración de hierro en el medio de cultivo. En este trabajo se demuestra que el gen *luxI* de *B. japonicum* ve reducida su expresión en condiciones limitantes de hierro. En la bibliografía se ha descrito la habilidad del hierro para controlar sistemas regulados por QS en distintos microorganismos. En *Pseudomonas*, la respuesta a estrés oxidativo se regula por QS y por la disponibilidad de hierro en el medio (Hassett et al. 1997; Hassett et al. 1999; Bollinger et al. 2001). La ausencia de hierro provoca un incremento de la expresión de *lasI* y en condiciones de exceso o carencia del mismo la regulación por QS del gen *sodA* puede verse anulada (Bollinger et al. 2001). Además, igual que en la región promotora de *luxI* de *B. japonicum*, en la región promotora de *sodA* se ha identificado una posible caja Fur a continuación de una caja Lux (Escolar et al. 1999). En *B. japonicum* USDA110 se ha demostrado que los genes *nolA* y *nodYABC*, regulados por QS, alcanzan su máximo de expresión en condiciones de ausencia de hierro (Loh et al.

2002), a pesar de no haber sido identificada ninguna posible caja Fur en la región promotora de estos genes (Hamza et al. 2000).

Los estudios de expresión desarrollados con la fusión transcripcional $P_{luxR-lacZ}$ en aerobiosis revelan que la expresión del gen *luxR*, en las cepas USDA110 y 0852, no depende de la densidad celular. Por lo tanto, mientras que la expresión de *luxI* está regulada por QS, la regulación de *luxR* no depende la densidad celular, lo que confirmaría que los ambos genes se localizan en unidades transcripcionales diferentes. Por otro lado, en la cepa parental se observan valores de expresión de *luxR* un 50% superiores a los de la mutante, demostrando que la expresión de *luxR* depende de alguno del producto o productos sintetizados por LuxI, como sucede en los sistemas TraR/I de *R. leguminosarum* *bv. viciae* A34 (Wilkinson et al. 2002) y Rai R/I de *R. etli* CNPAF512 (Rosemeyer et al. 1998).

El modelo de regulación de los genes *luxRI* de *B. japonicum* USDA110 propuesto en función de los datos de regulación de los genes *luxR* y *luxI* en aerobiosis se muestra de manera esquemática en la figura 1. A baja densidad celular LuxI sintetiza una cantidad suficiente de moléculas autoinductoras responsables de controlar la expresión de *luxR* que alcanza un valor máximo y constante que no depende del nivel de población. Cuando la densidad celular aumenta también lo hace la concentración de autoinductores en el interior celular, facilitándose la unión de dichos compuestos a LuxR que a su vez se une la caja *lux* provocando un incremento de la expresión de *luxI*. Se desconoce si LuxI es responsable de la síntesis de uno o varios autoinductores. En caso de ser varios autoinductores sería necesario estudiar cual o cuales de ellos intervienen en la regulación de *luxR* y *luxI*. Tanto a bajas como a elevadas densidades celulares, la expresión del gen *luxI* depende positivamente de la concentración de Fe^{3+} en el medio.

Baja densidad celular



Elevada densidad celular

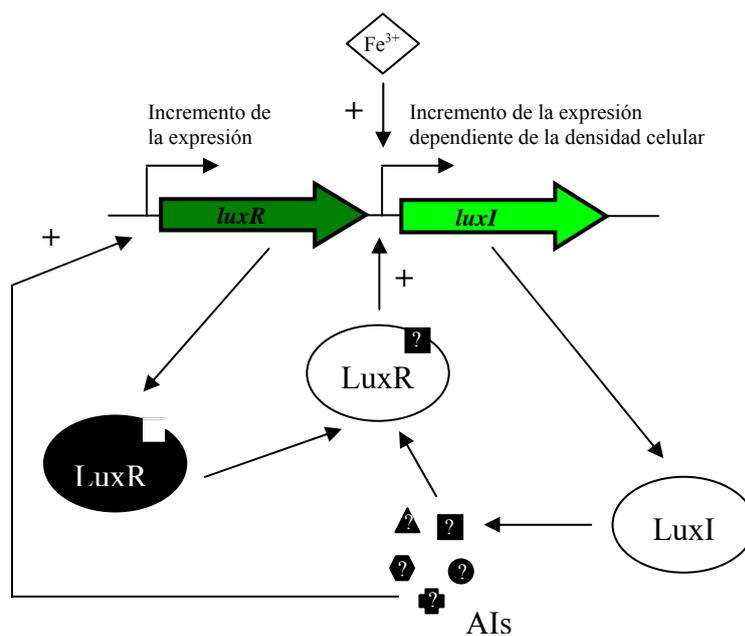


Figura 1. Modelo de regulación de los genes *luxRI* de *B. japonicum* USDA110. Se El modelo de regulación por QS propuesto se describe en condiciones no limitantes de oxígeno y en presencia de Fe^{3+} . Las líneas discontinuas indican débiles valores de expresión y síntesis de autoinductores, mientras que las líneas continuas están referidas a incrementos o valores máximos.

El estudio de la regulación de *luxI* en condiciones limitantes de oxígeno es fundamental para conocer en *B. japonicum* la implicación de este sistema regulado por QS en la expresión de genes que controlan la fijación de nitrógeno y la nodulación en simbiosis con plantas de soja (Sciotti et al. 2003). En anaerobiosis no se observó que el gen *luxI* estuviera regulado por QS de ni en la cepa parental ni en la mutante. Los valores de expresión en la cepa parental sólo fueron superiores a los de la cepa mutante en un 30% por lo que se considera que no existen diferencias significativas de expresión entre ambas cepas. La expresión en la cepa parental se redujo entre un 40% y un 70% respecto a los valores obtenidos en aerobiosis y en ambas cepas se observó una tendencia a la disminución de la expresión de *luxI*, llegando a alcanzarse valores un 50% inferiores a los de la cepa 0852 en aerobiosis a las 240 horas de incubación. Todos estos datos sugieren que el sistema de regulación por QS del gen *luxI* descrito en aerobiosis no es activo en condiciones limitantes de oxígeno, pudiendo encontrarse incluso bloqueado o negativamente regulado a través de otros sistemas que se ponen en funcionamiento en anaerobiosis y que podrían estar relacionados con sistemas de QS y la producción de autoinductores (Dong y Zhang, 2004; Rasmussen y Givskov, 2006).

5.2.2. Regulación en otros fondos genéticos

En algunas bacterias de la familia de los rizobios se han descrito genes de la familia *luxRI* regulados por QS e implicados en procesos de simbiosis (González y Marketon, 2003). Para comprobar si la regulación del gen *luxI* de *B. japonicum* dependía de genes relacionados con la nodulación y fijación de nitrógeno (Loh y Stacey, 2003; Sciotti et al. 2003) se estudió su expresión en los fondos genéticos de cepas mutadas en los genes *nolA*, *nodD2*, *nws*, *nifA*, *rpoN_{1/2}*, *fixL* y *fixK₂*. Puesto que algunas de las moléculas que codifican estos genes son activas en condiciones limitantes de oxígeno el estudio se realizó tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, realizando estos últimos cultivos en inducción a partir de una densidad óptica de aproximadamente 0,2 ya que las mutantes *nifA*, *fixL* y *fixK₂* son incapaces de crecer sin oxígeno (Sciotti et al. 2003).

En aerobiosis las diferencias de expresión respecto de la cepa USDA110 no resultaron ser significativas aunque siguieron tres patrones: un ligero aumento para los genes de la nodulación, una disminución para *rpoN_{1/2}* y *nifA*, y valores de expresión muy similares a los de la cepa parental para *fixL* y *fixK₂*. En anaerobiosis se observaron

ligeras variaciones de expresión en las cepas mutadas en los genes *nolA*, *nodD2*, *nws*, *nifA*, *fixL* y *fixK₂*, que fueron poco destacables. Sin embargo al comparar estos valores con los obtenidos en aerobiosis, se pone de manifiesto una tendencia global de reducción de la expresión de *luxI* en ausencia de oxígeno que es similar a la que presenta la cepa parental. Este hecho sugiere que ninguno de los genes mutados en estas cepas está implicado en la ausencia de regulación por QS o en la regulación negativa de *luxI* en anaerobiosis propuesta anteriormente. Respecto a esta ausencia de regulación o regulación negativa, se ha descrito que a pHs básicos ciertos autoinductores pierden estabilidad y se degradan (Byers et al. 2001). Si suponemos que en el control de la expresión de *luxI* intervienen autoinductores, podríamos pensar en el pH del medio como causa de la desregulación en anaerobiosis. En este trabajo, se ha comprobado que tanto en aerobiosis como en anaerobiosis la progresiva alcalinización del medio de cultivo de *B. japonicum* es similar (no se muestran los resultados). Este dato junto con el hecho de que la expresión $P_{luxI-lacZ}$ en *B. japonicum* USDA110 en aerobiosis no presenta reducción alguna demuestra que el incremento del pH del medio no es la causa de la reducción de la expresión en anaerobiosis y parece confirmar que el pH no interfiere con el sistema LuxR/I identificado.

La mayor diferencia de expresión detectada en anaerobiosis tuvo lugar en la cepa mutada en *rpoN_{1/2}*. La reducción de expresión de *luxI* que se produjo fue del 60% respecto de la cepa parental en las mismas condiciones. Este resultado junto con la identificación de un posible sitio de unión de la proteína RpoN en la región promotora de *luxI* indica que el factor σ^{54} podría intervenir en la regulación de este gen en anaerobiosis del mismo modo que en *Pseudomonas aeruginosa* controla la expresión de los genes *lasRI* y *rhlRI* regulados por QS e implicados en la producción de factores de virulencia (Heurlier et al. 2003; Thompson et al. 2003). El factor σ^{54} que se uniría al sitio de unión identificado en la región promotora de *luxI* sería el que codifica el gen *rpoN₂* puesto que en la cepa mutada en el gen *fixK₂*, por el que se regula, no se han observado diferencias significativas de expresión de $P_{luxI-lacZ}$ respecto de la parental.

5.3. Producción de autoinductores

El estudio de la producción de autoinductores en diferentes cepas de *B. japonicum*, en vida libre y en simbiosis, se llevó a cabo con los bioindicadores *C.*

violaceum CV026 (McClellan et al. 1997) y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 (Chao et al. 1998). Se emplearon ambos sistemas porque detectan moléculas autoinducidas de diferente estructura, y esto permitió cubrir un amplio rango de detección. La separación por TLC de los compuestos presentes en los extractos con actividad autoinducida, permitió cuantificar el número de autoinducidos producidos. Muchos rizobios sintetizan diferentes especies de autoinducidos muy apolares que migran mostrando diferentes R_fs cuando se emplea como fase móvil 60:40 de metanol-agua (Cha et al. 1998), que es la que se ha empleado en este trabajo.

5.3.1. *B. japonicum* USDA110 y 0852 en vida libre

La mutación del gen *luxI* de *B. japonicum* tuvo como resultado la cepa 0852 que presentó diferencias respecto de la cepa parental USDA110 en la producción de autoinducidos en vida libre y en simbiosis.

El bioensayo realizado con *C. violaceum* CV026 resultó ser el más sensible para los autoinducidos producidos por *B. japonicum* siempre que se aplicaron extractos procedentes de un mínimo de 125 ml de cultivo crecido al menos hasta el principio de la fase estacionaria. Como ya se ha descrito anteriormente este bioensayo realizado en placa petri es positivo cuando se forma un halo blanco, resultado de la inhibición de la producción de violaceína, con crecimiento bacteriano sobre un fondo violeta. En este tipo de bioensayo es muy importante asegurarse de que el halo formado es el resultado de la inhibición de producción de violaceína y no el resultado de un efecto biocida (McClellan et al. 1997). Se ha comprobado que medios de cultivo no inoculados que contenían antibióticos como kanamicina, cloramfenicol, gentamicina, tetraciclina, espectinomomicina y estreptomomicina, cuyas concentraciones eran las habitualmente empleadas en cultivos de *B. japonicum* (ver Material y Métodos), cuando se aplicaban a bioensayos con *C. violaceum* CV026 separadamente o combinados, frescos o tras diez días de incubación a 30°C, formaban un falso halo de inhibición debido a la ausencia de crecimiento de bioindicador (no se muestran los resultados). Este halo de inhibición fue más intenso cuando se aplicaron medios con antibióticos incubados durante diez días. Por lo tanto, para no dar lugar a posibles falsos positivos, en este trabajo los cultivos cuyos sobrenadantes libres de células se emplearon para comprobar la presencia de actividad autoinducida, se incubaron en ausencia de antibióticos.

Estudios previos de detección de autoinductores en extractos de sobrenadante de *B. japonicum* USDA110 aplicando el bioensayo que utiliza la cepa *C. violaceum* CV026 demostraron la existencia de una intensa actividad autoinductora (Brelles-Mariño y Bedmar, 2001). La separación mediante TLC y revelado con el mismo sistema de bioensayo determinó que la actividad autoinductora del citado extracto era producida por un único compuesto cuyo Rf fue 0,64. En este trabajo se ha comprobado una clara pérdida de actividad autoinductora en extractos del sobrenadante de la cepa 0852 detectada para un único compuesto cuyo Rf fue 0,58. A pesar de que ambos compuestos se detectan con el mismo bioindicador, la patente diferencia de actividad entre ellos y la diferencia del valor de los Rfs sugieren que se trata de dos compuestos diferentes.

Hasta el momento la detección con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 de moléculas con actividad autoinductora llevada a cabo a partir de 10 ml de sobrenadante de *B. japonicum* USDA110 había resultado negativa (Pongsilp et al). En este trabajo se demuestra que, al igual que en ensayos revelados con *C. violaceum* CV026, son necesarios extractos procedentes de un mínimo de 125 ml de sobrenadante bacteriano crecido hasta el principio de la fase estacionaria ($DO_{600}=0,6-0,7$) para detectar señal de autoinducción de compuestos sintetizados por *B. japonicum* USDA110. El revelado de bioensayos de extractos de sobrenadantes de las cepas USDA110 y 0852 resultó positivo en ambos casos. Las TLCs desarrolladas resultaron en un único compuesto revelado para el extracto de USDA110 y dos para la cepa 0852, cuyos respectivos Rfs fueron 0,71, 0,68 y 0,41. La ligera diferencia de valor de los Rfs entre AiLA1p y AiLA1m no deja del todo claro que se trate de dos compuestos diferentes. Sin embargo sí existe una marcada diferencia respecto del Rf del compuesto de AiLA2m, que sería un nuevo compuesto sintetizado por la cepa mutante.

Las señales de autoinducción resultado de los bioensayos con *C. violaceum* CV026 fueron de mayor intensidad que las obtenidas con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4, lo que nos hace pensar que la regulación de la producción de autoinductores en *B. japonicum* USDA110 depende de una cascada de regulación en la que podrían intervenir varios sistemas controlados por QS. En *R. leguminosarum* *bv. viciae* A34 se ha descrito una compleja cascada de regulación por QS en las están implicados los sistemas CinR/I, RhiR/I, TraR/I-BisR y RaiR/I (Lithgow et al. 2000; Cubo et al. 1992; Wilkinson et al. 2002; Wisniewski-Dye et al. 2002). La regulación del sistema RaiR/I de *R. etli* CNPAF512 depende a su vez del sistema CinR/I (Rosemeyer et al. 1998; Daniels et al. 2002). En *B. japonicum* se activarían en primer lugar los sistemas cuyos

autoinductores son detectados por *C. violaceum* CV026. Estos autoinductores activarían, a su vez otros niveles de la cascada de regulación en los que intervendrían sistemas responsables de la síntesis de los autoinductores revelados con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Todos los datos expuestos no permiten concretar con mayor exactitud el desarrollo de la cascada de regulación y tampoco determinar que la molécula responsable de la actividad autoinductora implicada en la regulación de *luxI* sea AiLC1p.

5.3.2. Producción de autoinductores por otras cepas en vida libre

La detección de autoinductores en extractos de los sobrenadantes de cultivos de las cepas mutadas en los genes *nolA*, *nodD2*, *nws*, *nifA*, *rpoN_{1/2}*, *fixL* y *fixK₂* incubados en condiciones aeróbicas se realizó empleando las dos cepas bioindicadoras citadas. La TLC realizada con extractos de sobrenadantes de las cepas *nolA*, *nodD2*, *nws*, *nifA* y *fixK₂* revelada con *C. violaceum* CV026 detectó un único autoinductor por cepa cuyo Rf fue similar al de AiLC1p de USDA110 pero que presentó una importante pérdida de actividad respecto de la cepa parental. El revelado de la TLC con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 mostró diferentes patrones de moléculas por cepa que se pueden agrupar en dos categorías: la categoría similar a AiLA1p y AiLA1m con Rfs entre 0,74 y 0,66; y la categoría similar a AiLA2m cuyos Rfs oscilan entre 0,50 y 0,43. Las moléculas detectadas en los extractos de sobrenadantes de las cepas 9043, D21 y NWS mediante este último sistema presentan el mismo patrón que la mutante en *luxI*, mientras que *C. violaceum* CV026 revela en dichos extractos una molécula con Rf similar a AiLC1p de USDA110. Estos dos patrones junto con el hecho de que los valores de expresión de $P_{luxI-lacZ}$ no se vieran significativamente alterados en los fondos genéticos de estas cepas parecen confirmar que la molécula AiLC1p es la mejor candidata a ser la molécula autoinductora en el sistema LuxR/I de *B. japonicum* USDA110.

Las mutantes *rpoN_{1/2}* y *fixL* en bioensayos con *C. violaceum* CV026 no presentaron actividad autoinductora. La TLC revelada con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 reveló una tercera categoría de autoinductores compuesta por las moléculas AiLA3f y AiLA3r, cuyos respectivos Rfs fueron 0,21 y 0,17. Puesto que en estas cepas se observaron valores de autoinducción de *luxI* similares a los de la cepa parental, parece lógico pensar que la ausencia de actividad autoinductora con *C. violaceum* CV026 se deba a una interferencia en el bioensayo posiblemente provocada por AiLA3f y AiLA3r

y que conlleva la interrupción del sistema de detección. Si la inexistencia de señal fuera realmente originada porque no se sintetiza AiLC1p, podría deberse a que AiLA3f y AiLA3r actúan como moléculas suplentes del sistema de autoinducción.

5.4. Efecto de la inoculación de plantas de soja con la cepa de *B. japonicum* alterada en el gen *luxI*

El fenotipo simbiótico de las plantas de soja (*Glycine max*) inoculadas con la cepa 0852 no mostró diferencias en el número de nódulos, peso seco de las plantas, ni en el contenido de leghemoglobina y nitrógeno fijado respecto de las inoculadas con la cepa parental. Plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con mutantes en los genes que componen el sistema CinR/I de *R. etli* CNPAF512 tampoco muestran diferencias en el número de nódulos ni en el peso seco de planta, aunque se han detectado alteraciones en el desarrollo del simbiosoma (Daniels et al. 2002). Las micrografías de microscopía electrónica realizadas en nódulos de *Glycine max* formados separadamente por las cepas USDA110 y 0852 demuestran que el producto o productos sintetizados por *luxI* en simbiosis podrían estar implicados en el mantenimiento de la estabilidad del simbiosoma en fases avanzadas de desarrollo de la planta. Esta observación debería confirmar una disminución de la reducción de acetileno en nódulos formados por 0852, que sería indicativa de la ineficiencia en la fijación de nitrógeno provocada por el envejecimiento precoz de los nódulos.

Se detectó señal autoinductora en el citosol de nódulos y bacteroides de nódulos de ambas cepas después de revelarse con *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Una vez realizados los extractos con acetato de etilo a partir del citosol de nódulos y bacteroides, las muestras resultantes presentaron igualmente actividad a excepción de los extractos del citosol de nódulos de 0852 y del citosol de los bacteroides de ambas cepas. Dichos extractos no mostraron actividad en el bioensayo con *C. violaceum* CV026 sugiriendo que la actividad autoinductora detectada antes de la extracción podría estar producida por sustancias con características químicas diferentes a otros autoinductores bacterianos que disolvente orgánico es capaz de seleccionar (Teplitski et al. 2000). Estas moléculas podrían ser secretadas por las plantas e imitar la capacidad autoinductora de compuestos de origen bacteriano (Teplitski et al. 2000; Daniels et al. 2002).

El número de compuestos detectados en TLC revelada con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 y sus patrones de migración fueron exactamente iguales en las cepas USDA110 y 0852. AiSnC1p fue la única sustancia detectada en TLC con *C. violaceum* CV026 en el citosol de los nódulos formados por la cepa parental y que no pudo ser identificada en extractos de nódulos formados por *B. japonicum* 0852. El Rf de dicho compuesto resultó ser el mismo que el de AiLC1p sintetizado en vida libre por la cepa parental. A partir de estos datos podemos afirmar que AiSnC1p sería un producto de *luxI*, producido en los bacteroides y capaz de difundir a través de la membrana celular (Gray 1997; Fuqua y Greenberg, 1998; Fuqua et al. 2001; Parseck y Greenberg, 2000; Whitehead et al. 2001; Bassler 2002) para acumularse en el citosol del nódulo. Dicho compuesto además de actuar como factor de protección para evitar la senescencia precoz del simbiosoma se autorregula del mismo modo descrito en vida libre en presencia de oxígeno, como lo demuestran los ensayos de expresión de la fusión P_{luxI} -*lacZ* realizados en bacteroides de las cepas parental y mutante *luxI*, y a pesar de lo que pudiera parecer a partir del análisis de expresión realizado en vida libre en condiciones limitantes de oxígeno. De la misma forma, también se ha descrito que el gen *cinI* de *R. etli* CNPAF512 está positivamente autorregulado en bacteroides (Daniels et al. 2002).

6. CONCLUSIONES

- 6.1 Los genes *luxRI* constituyen un sistema de regulación por QS en el que *luxI* se autorregula y podría codificar la producción de la sintasa LuxI posiblemente implicada en la producción de varias moléculas autoinductoras. El modelo de regulación del sistema LuxR/I presenta dos etapas: a baja densidad celular *luxI* se expresa constitutivamente de forma que los niveles basales de moléculas autoinductoras que serían sintetizadas por la proteína LuxI controlarían la expresión de *luxR* que es independiente del nivel de población existente. A elevadas densidades celulares el incremento de la concentración de autoinductores en el interior celular facilitaría la unión de dichos compuestos a LuxR que a su vez se uniría a la caja Lux provocando el progresivo incremento de la expresión de *luxI* que alcanza su máximo nivel de expresión al principio de la fase estacionaria del cultivo.
- 6.2 La expresión del gen *luxI* en aerobiosis depende positivamente de la concentración de hierro presente en el medio de cultivo pudiendo estar implicada en esta regulación la caja Fur identificada en la región intergénica de *luxRI* en la zona anterior a la caja Lux.
- 6.3 El sistema LuxR/I regulado por QS no es activo en condiciones limitantes de oxígeno sugiriendo la existencia en *B. japonicum* de otros sistemas que serían funcionales en anaerobiosis y que bloquearían o regularían negativamente el sistema LuxR/I en estas condiciones de cultivo.
- 6.4 La regulación del gen *luxI* no depende de los genes *nolA*, *nodD2*, *nws*, relacionados con la nodulación, ni de los genes *nifA*, *fixL* y *fixK₂* implicados en la fijación de nitrógeno. Por lo tanto la síntesis de los productos que codifica *luxI* estaría incluida en una cascada regulatoria independiente a las anteriores.
- 6.5 El producto del gen *rpoN₂* que codifica el factor σ^{54} podría intervenir en la regulación del gen *luxI* en anaerobiosis mediante unión al sitio RpoN identificado en la región promotora del gen que controla.

- 6.6 En el bioensayo reverso con *C. violaceum* CV026, el empleo de sobrenadantes libres de células procedentes de cultivos bacterianos crecidos en presencia de antibioticos da lugar a falsos positivos que inducen a error sobre la presencia de autoinductores en los sobrenadantes problema.
- 6.7 La concentración de los extractos preparados en acetato de etilo a partir de sobrenadantes de cultivos de *B. japonicum* mínima necesaria para detectar señal autoinductora en los bioensayos revelados con *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 es de 125 ml equivalentes.
- 6.8 La detección con los bioindicadores *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 de señales de autoinducción con diferentes Rfs y diferente intensidad en extractos de sobrenadantes de cepas de *B. japonicum* sugiere la existencia de una compleja cascada de regulación en la que primero se sintetizarían las moléculas detectadas por *C. violaceum* CV026 y a continuación, en un segundo nivel de la cascada de regulación, lo harían los compuestos que revela *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 activados por los primeros.
- 6.9 El compuesto AiLC1p podría ser la molécula autoinductora del sistema LuxR/I de *B. japonicum* USDA110 cuya función de autoinducción sería desempeñada también por AiLA3f y AiLA3r en las mutantes en *rpoN*_{1/2} y *fixL*.
- 6.10 El producto AiSnC1p detectado en extractos del citosol de nódulos formados por *B. japonicum* USDA110 en plantas de soja (*Glycine max*) actúa como factor de protección frente a la senescencia precoz del nódulo.
- 6.11 El compuesto AiSnC1p se identifica con AiLC1p detectado en extractos de sobrenadantes libres de células de la misma cepa puesto que que ambos autoinductores presentan el mismo el Rf.
- 6.12 El gen *luxI* es el responsable de la síntesis de AiSnC1p en nódulos de soja y por extensión interviene en la producción de AiLC1p en vida libre.

8. BIBLIOGRAFIA

Allen C, Gay J, Simon-Buela L. 1997. A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence functions in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 10:1054-1064.

Bainton NJ, Stead P, Chhabra SR, Bycroft BW, Salmond GP, Stewart GS, Williams P. 1992. N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 288 (Pt 3):997-1004.

Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJ, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* 24:555-566.

Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* 9:773-786.

Bassler BL, Wright M, Silverman MR. 1994. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* 13:273-286.

Bedmar EJ, Robles EF, Delgado MJ. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans* 33:141-144.

Bergersen FJ. 1977. *A Treatise on Dinitrogen Fixation*, section III: Biology, pp. 519-556. *En Hardy RW y Silver W (eds.)*, Wiley. Nueva York, N.Y.

Brencic A, Winans SC. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:155-194.

Brumbley SM, Carney BF, Denny TP. 1993. Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *PhcA*, a putative LysR transcriptional regulator. *J Bacteriol* 175:5477-5487.

Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11:1119-1129.

Challan Belval S, Gal L, Margiewes S, Garmyn D, Piveteau P, Guzzo J. 2006. Assessment of the roles of LuxS, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol* 72:2644-2650.

Chatterjee A, Cui Y, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK. 1995. Inactivation of rsmA leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl Environ Microbiol* 61:1959-1967.

Chatterjee S, Sonti RV. 2002. rpfF mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 15:463-471.

Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczer I, Bassler BL, Hughson FM. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415:545-549.

Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:3672-3676.

Choi SH, Greenberg EP. 1992. Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* 174:4064-4069.

Cubo MT, Economou A, Murphy G, Johnston AW, Downie JA. 1992. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes rhiABCR that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J Bacteriol* 174:4026-4035.

Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK. 1995. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *J Bacteriol* 177:5108-5115.

da Silva FR, Vettore AL, Kemper EL, Leite A, Arruda P. 2001. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiol Lett* 203:165-171.

Daniels R, De Vos DE, Desair J, Raedschelders G, Luyten E, Rosemeyer V, Verreth C, Schoeters E, Vanderleyden J, Michiels J. 2002. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J Biol Chem* 277:462-468.

Daniels R, Reynaert S, Hoekstra H, Verreth C, Janssens J, Braeken K, Fauvart M, Beullens S, Heusdens C, Lambrichts I, De Vos DE, Vanderleyden J, Vermant J, Michiels J. 2006. Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14965-14970.

de Nys R, Givskov M, Kumar N, Kjelleberg S, Steinberg PD. 2006. Furanones. *Prog Mol Subcell Biol* 42:55-86.

Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 68:1754-1759.

Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817.

Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. 2000. *AiiA*, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3526-3531.

Dow JM, Daniels MJ. 1994. Pathogenicity determinants and global regulation of pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Curr Top Microbiol Immunol* 192:29-41.

Downie JA, Rossen L, Knight CD, Robertson JG, Wells B, Johnston AW. 1985. *Rhizobium leguminosarum* genes involved in early stages of nodulation. *J Cell Sci Suppl* 2:347-354.

Drechsel H, Jung G. 1998. Peptide siderophores. *J Pept Sci* 4:147-181.

Dunlap PV, Kuo A. 1992. Cell density-dependent modulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system in the absence of autoinducer and LuxR protein. *J Bacteriol* 174:2440-2448.

Egland KA, Greenberg EP. 1999. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol Microbiol* 31:1197-1204.

Engebrecht J, Silverman M. 1987. Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res* 15:10455-10467.

Federle MJ, Bassler BL. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 112:1291-1299.

Fischer HM, Alvarez-Morales A, Hennecke H. 1986. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonicum* *nifA* gene is involved in control of *nif* gene expression and formation of determinate symbiosis. *Embo J* 5:1165-1173.

Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 26:251-259.

Fray RG. 2002. Altering plant-microbe interaction through artificially manipulating bacterial quorum sensing. *Ann Bot (Lond)* 89:245-253.

Freeman JA, Bassler BL. 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* 31:665-677.

Freeman JA, Bassler BL. 1999. Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 181:899-906.

Freeman JA, Lilley BN, Bassler BL. 2000. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* 35:139-149.

Fukushima J, Ishiwata T, Kurata M, You Z, Okuda K. 1994. Intracellular receptor-type transcription factor, LasR, contains a highly conserved amphipathic region which precedes the putative helix-turn-helix DNA binding motif. *Nucleic Acids Res* 22:3706-3707.

Fuqua C, Burbea M, Winans SC. 1995. Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the traM gene. *J Bacteriol* 177:1367-1373.

Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35:439-468.

Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50:727-751.

Fuqua WC, Winans SC. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* 176:2796-2806.

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269-275.

Garcia M, Dunlap J, Loh J, Stacey G. 1996. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* 9:625-636.

Garg RP, Huang J, Yindeeyoungyeon W, Denny TP, Schell MA. 2000. Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 182:6659-6666.

Gilson L, Kuo A, Dunlap PV. 1995. *AinS* and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* 177:6946-6951.

Gonzalez JE, Marketon MM. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:574-592.

Gottfert M, Hitz S, Hennecke H. 1990. Identification of *nodS* and *nodU*, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum* *nodYABC* and *nodIJ* genes. *Mol Plant Microbe Interact* 3:308-316.

Gottfert M, Holzhauser D, Bani D, Hennecke H. 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Mol Plant Microbe Interact* 5:257-265.

Gould P, Maguire M, Lund PA. 2006. Distinct mechanisms regulate expression of the two major *groEL* homologues in *Rhizobium leguminosarum*. *Arch Microbiol*.

Gray KM, Pearson JP, Downie JA, Boboye BE, Greenberg EP. 1996. Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *J Bacteriol* 178:372-376.

Grob P, Michel P, Hennecke H, Gottfert M. 1993. A novel response-regulator is able to suppress the nodulation defect of a *Bradyrhizobium japonicum* nodW mutant. *Mol Gen Genet* 241:531-541.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166:557-580

Hanzelka BL, Parsek MR, Val DL, Dunlap PV, Cronan JE, Jr., Greenberg EP. 1999. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* 181:5766-5770.

Heurlier K, Denervaud V, Haas D. 2006. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296:93-102.

Heurlier K, Denervaud V, Pessi G, Reimann C, Haas D. 2003. Negative control of quorum sensing by RpoN (σ^{54}) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185:2227-2235.

Johnston AW, Yeoman KH, Wexler M. 2001. Metals and the rhizobial-legume symbiosis--uptake, utilization and signalling. *Adv Microb Physiol* 45:113-156.

Jones S, Yu B, Bainton NJ, Birdsall M, Bycroft BW, Chhabra SR, Cox AJ, Golby P, Reeves PJ, Stephens S, et al. 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Embo J* 12:2477-2482.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing

symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (supplement). DNA Res 9:225-256.

Kinscherf TG, Willis DK. 1999. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. J Bacteriol 181:4133-4136.

Kullik I, Fritsche S, Knobel H, Sanjuan J, Hennecke y Fischer HM. 1991. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the σ^{54} gene (*rpoN*). J Bacteriol. 173:1125-1138.

Lee SJ, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT, Lee JK. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 68:3919-3924.

Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. Cell 118:69-82.

Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR, Zhang LH. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Mol Microbiol 47:849-860.

Lithgow JK, Wilkinson A, Hardman A, Rodelas B, Wisniewski-Dye F, Williams P, Downie JA. 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. Mol Microbiol 37:81-97.

Llamas I, Keshavan N, Gonzalez JE. 2004. Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain N-acyl homoserine lactones. Appl Environ Microbiol 70:3715-3723.

Leonard LT. 1943. A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. J Bacteriol. 45: 523-527.

Loh J, Carlson RW, York WS, Stacey G. 2002. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14446-14451.

Loh J, Pierson EA, Pierson LS, 3rd, Stacey G, Chatterjee A. 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 5:285-290.

Loh J, Stacey G. 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Appl Environ Microbiol* 69:10-17.

Loh JT, Stacey G. 2001. Feedback regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Mol Microbiol* 41:1357-1364.

Loh JT, Yuen-Tsai JP, Stacey MG, Lohar D, Welborn A, Stacey G. 2001. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Mol Microbiol* 42:37-46.

Mae A, Montesano M, Koiv V, Palva ET. 2001. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1035-1042.

Maier RJ y Brill WJ. 1978. Involvement of *Rhizobium japonicum* O antigen in soybean nodulation. *J Bacteriol.* 133:1295-1299.

Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, Gonzalez JE. 2002. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* 184:5686-5695.

Martinelli D, Grossmann G, Sequin U, Brandl H, Bachofen R. 2004. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiol* 4:25.

McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143 (Pt 12):3703-3711.

Miles A y Misra S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg.* 38:732.

Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS. New York.

More MI, Finger LD, Stryker JL, Fuqua C, Eberhard A, Winans SC. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272:1655-1658.

Nealson KH, Hastings JW. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 43:496-518.

Nealson KH, Platt T, Hastings JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313-322.

Nellen-Anthamatten D, Rossi P, Preisig O, Kullik I, Babst M, Fischer HM, Hennecke H. 1998. Bradyrhizobium japonicum FixK2, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J Bacteriol* 180:5251-5255.

Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48:1429-1449.

Omura S, Murata M, Imamura N, Iwai Y, Tanaka H, Furusaki A, Matsumoto H. 1984. Oxetin, a new antimetabolite from an actinomycete. Fermentation, isolation, structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 37:1324-1332.

Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1490-1494.

Pesci EC, Iglewski BH. 1997. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends Microbiol* 5:132-134; discussion 134-135.

Piper KR, Beck Von Bodman S, Hwang I, Farrand SK. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32:1077-1089.

Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R, Palva ET. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J* 12:2467-2476.

Pongsilp N, Triplett EW, Sadowsky MJ. 2005. Detection of homoserine lactone-like quorum sensing molecules in bradyrhizobium strains. *Curr Microbiol* 51:250-254.

Poplawsky AR, Chun W. 1997. *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* 179:439-444.

Poplawsky AR, Chun W. 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Mol Plant Microbe Interact* 11:466-475.

Prentki P y Krisch HM. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*. 29:101-106.

Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL. 1997. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 179:7530-7537.

Qin Y, Luo ZQ, Smyth AJ, Gao P, Beck von Bodman S, Farrand SK. 2000. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *Embo J* 19:5212-5221.

Ragland M, Theil EC. 1993. Ferritin (mRNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Mol Biol* 21:555-560.

Rasmussen TB, Givskov M. 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* 152:895-904.

Rasmussen TB, Givskov M. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* 296:149-161.

Reading NC, Sperandio V. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 254:1-11.

Regensburger B y Hennecke H. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch Microbiol*. 135:103-109.

Reimann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, Krishnapillai V, Zala M, Heurlier K, Triandafillu K, Harms H, Defago G, Haas D. 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 148:923-932.

Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.

Rigaud J y Puppò A. 1975. Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J Gen. Microbiol*. 88:223-228.

Rodelas B, Lithgow JK, Wisniewski-Dye F, Hardman A, Wilkinson A, Economou A, Williams P, Downie JA. 1999. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (rhi) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* 181:3816-3823.

Rodríguez RL y Tait RC. 1983. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.

Rosemeyer V, Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J. 1998. luxI- and luxR-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol* 180:815-821.

Sadowsky MJ, Cregan PB, Gottfert M, Sharma A, Gerhold D, Rodriguez-Quinones F, Keyser HH, Hennecke H, Stacey G. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum* nola gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:637-641.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, N.Y.

Schaefer AL, Hanzelka BL, Eberhard A, Greenberg EP. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol* 178:2897-2901.

Schell MA. 2000. Control of Virulence and Pathogenicity Genes of *Ralstonia Solanacearum* by an Elaborate Sensory Network. *Annu Rev Phytopathol* 38:263-292.

Schlaman HR, Horvath B, Vijgenboom E, Okker RJ, Lugtenberg BJ. 1991. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J Bacteriol* 173:4277-4287.

Shiner EK, Reddy S, Timmons C, Li G, Williams SC, Rumbaugh KP. 2004. Construction of a bacterial autoinducer detection system in mammalian cells. *Biol Proced Online* 6:268-276.

Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC. 2005. Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* 29:935-947.

Simon R, Priefer U y Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology*. 1:784-791.

Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:257-288.

Stevens AM, Dolan KM, Greenberg EP. 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12619-12623.

Swift S, Winson MK, Chan PF, Bainton NJ, Birdsall M, Reeves PJ, Rees CE, Chhabra SR, Hill PJ, Throup JP, et al. 1993. A novel strategy for the isolation of luxI homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol Microbiol* 10:511-520.

Tans-Kersten J, Huang H, Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol* 183:3597-3605.

Thompson LS, Webb JS, Rice SA, Kjelleberg S. 2003. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhII* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 220:187-195.

Thorne SH, Williams HD. 1999. Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*: identification of the role of an N-acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival. *J Bacteriol* 181:981-990.

Throup JP, Camara M, Briggs GS, Winson MK, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS. 1995. Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* 17:345-356.

Tun-Garrido C, Bustos P, Gonzalez V, Brom S. 2003. Conjugative transfer of p42a from rhizobium etli CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* 185:1681-1692.

Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook 15. Blackwell. Oxford.

Visick KL, McFall-Ngai MJ. 2000. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. *J Bacteriol* 182:1779-1787.

Wehland M, Kiecker C, Coplin DL, Kelm O, Saenger W, Bernhard F. 1999. Identification of an RcsA/RcsB recognition motif in the promoters of exopolysaccharide biosynthetic operons from *Erwinia amylovora* and *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *J Biol Chem* 274:3300-3307.

Wilkinson A, Danino V, Wisniewski-Dye F, Lithgow JK, Downie JA. 2002. N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* 184:4510-4519.

Williams P. 2006. Quorum sensing. *Int J Med Microbiol* 296:57-59.

Wisniewski-Dye F, Jones J, Chhabra SR, Downie JA. 2002. *raiR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 184:1597-1606.

Yang YH, Lee TH, Kim JH, Kim EJ, Joo HS, Lee CS, Kim BG. 2006. High-throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications. *Anal Biochem* 356:297-299.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4638-4643.

Zhang L, Murphy PJ, Kerr A, Tate ME. 1993. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 362:446-448.

Zhang LH, Dong YH. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 53:1563-1571.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Se muestra la secuencia de ADN de la región del cromosoma de *B. japonicum* USDA110 donde se localizan los marcos abiertos de lectura *blr1062* (verde oscuro) y *blr1063* (verde claro) con los sitios de inicio y fin de la transcripción señalados en color gris. En la secuencia se marcan también los cebadores empleados en la amplificación por PCR (en azul y subrayado), los posibles sitios de unión al ribosoma (rbs, en naranja con barra superior) y los sitios de unión a proteínas identificados (recuadros naranjas). Las enzimas de restricción empleadas en las diferentes estrategias de clonación desarrolladas se señalan en negro con barra superior.

Las secuencias aminoacídicas de las proteínas *B. japonicum* USDA110 codificadas por los citados marcos abiertos de lectura se muestran debajo de la secuencia de ADN. Los dominios de unión localizados aparecen recuadrados. La proteína sintetizada por *blr1062* presenta en el extremo N-terminal un dominio de unión a moléculas autoinductoras y en el C-terminal se localiza un dominio de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice. La proteína codificada por *blr1063* presenta un dominio conservado de síntesis de autoinductores del tipo LasI. Se marcan con subrayado grueso los aminoácidos idénticos a los de la secuencia consenso, y en subrayado fino los aminoácidos que, sin ser idénticos a la citada secuencia, tienen la misma función.

EcoRI

GAGATATCGACGATGATGGCGGAGTAATTTTCGCGGTTGGCGTGTTTCGACTAAAATCTG
 CGCGTTCAAATGGAAGGGCGGCGGCGTTCGCGCGATCTGTTGCATCGGCGTCGTCTGCTA
 GCTCGCCGGCCCTTCGGGCGATACGCTGTTTCGCGAACTCGGCGCGCTCGCTCTGTAGCA
 CCTCGCGCGCGAACTCGATGATCCTCTGCTTGTGTTGCCGTTTCACGGACGGCGAAAAAC
 ACGCGGTTCAATTCCAGGCCGAGCACGCTGTTGAGGGCGATGTTCTCGTCGTCCATCGT
 GG

Sitio de unión NifA

TTTTCCCGCTTTGTACGTCACAGGTGTAACCTTGACGTCCCTTCTTCCACAAGTAGATTA

HindIII

AAGCTTCGGAGCAGGCGGTTACCGGAGAACTACGGAAGCAGCGAATTGAGGCAGCCCCC

rbs

AAATACGTGCTATAGCGGACGACGAGGGTCAGGAAACGCACCGATGTCCGCGTCGATT

M S A V D

KpnI

ATGGCCGGAAGCGCTCGACTTCATCGAAGGCCTGGGTGTCTATCGCAAGGTACCGGAC

Y G R E A L D F I E G L G V Y R K V P D

GCCATGAACGCGCTTGAAGCGGCCTTCGGCCGTTTCGGCTTCGAAACTATCATTGTGAC

A M N A L E A A F G R F G E E T I I V T

GGGATTGCCGAATCCCGATCAGCGGTTTGCGCAGATGGTGCTCGCCAAGCGCTGGCCGG

G L P N P D Q R F A Q M V L A K R W P

CGGGATGGTTCAATCTCTACACTCAGAACA ACTATGACCGCTTCGATCCCGTGGTGCGG

A G W F N L Y T Q N N Y D R F D P V V R

CTGTGCCGCAATCGGTCAATCCGTTTCGAGTGGTTCGGAGGCGCCCTATGATGCCGAGCT

L C R Q S V N P F E W S E A P Y D A E L

CGAGCCGAGCGCGGCCGAGGTGATGAACCGCGCCGGCGATTTTCGCATGTTCGCGCGGCT

E P S A A E V M N R A G D F R M S R G

TCATCGTGCCGATCCACGGGCTCACCGGCTATGAAGCCGCGGTGTTCGCTCGGCGGCGTC

F I V P I H G L T G Y E A A V S L G G V

CATCTCGACCTCAATCCCCGCAGCAAGCCGGCGCTGCACCTAATGGCGATGTATGGCTT

H L D L N P R S K P A L H L M A M Y G F

MluI

CGACCACATTCGCCGTCTGCTCGAGCCGACGCCGTATCCGTGACGCGTCTCACCCCGC

D H I R R L L E P T P Y P S T R L T P

GCGAGCGCGAGGTGATCTCCTGGGCTTCGCAGGGCAAGTCGGCCTGGGAGATCGGCGAG

R E R E V I S W A S Q G K S A W E I G E

ATCCTGCACATCACGCAGCGCACCGCCGAAGAGCATCTTGCAACTGCTGCGCGCAAGCT

I L H I T Q R T A E E H L A T A A R K L

Sitio de unión a RpoN

Sitio de unión a Fur

CGGTGCGGTCAACCGTACGCATGCGGTTGCGCTGGCGATTTCGCCACAAGATCATCAATC

G A V N R T H A V A L A I R H K I I N

Caja lux

CCTAAGCGACGTACTGGGAAATTTCCCAATATCGAACCTGCCTCTTTTCGCAGAGGCT

P •

rbs

GCCCCCATTGAGGCTGAATGGGGTTTCCATGATTCACGCAATTTCCGCGGTCAATCG

M G V S M I H A I S A V N R

CCACTTATACGAGGACGTACTCGAGCAGCATTTCGGCTGCGTCATGACATCTTTGTTCG

H L Y E D V L E Q H F R L R H D I E V

AGGAGCGGCACTGGGAGACGCTGCGCAGGCCGGATGGCCGCGAGGTCGATTCCTATGAC

E E R H W E T L R R P D G R E V D S Y D

GACGAGGATACCGTCTATCTGCTTGGCTGGAGGGACGGCGCGTCGTCGGCGGCCACCG

D E D T V Y L L A L E G R R V V G G H R

GCTCTACCCACGACCAAGCCCTCGATGATGAGCGAGGTCTTCCCGCATCTGGCGGCGG

L Y P T T K P S M M S E V F P H L A A

BamHI

TTCGCGGCTGCCCTCGGATCCGCTGATCTGGGAATGGTCGCGCTACTTCGTCGTCCGC

V R G C P S D P L I W E W S R Y F V V R

GATCGCCGCGACGGCGCGCTCAACCTGCAACTGATGGCGGCGGTGCAGGAGTTCTGCCT

D R R D G A L N L Q L M A A V Q E F C L

CGACCAGGGAATCGCGCAGGTCAGCGCGATCATGGAAACCTGGTGGTTGCCGCGCTTCC

D Q G I A Q V S A I M E T W W L P R F

ACGAGGCCGGCTTCGTCGTGACGCCGCTCGGCCTGCCGGCTCTGGTCGAGAACGCCTGG

H E A G F V V T P L G L P A L V E N A W

ACCATGGCGGCCACCGTCGACATTCGTCGCCAGACGCTCGATGTCCTGCATGATCGCAT

T M A A T V D I R R Q T L D V L H D R I

CGGCATGCCTTCCATCGTGCAACAGGACGGCCCGCGTCTGGACGCCGTCGCCCGTGCCA

G M P S I V Q Q D G P R L D A V A R A

ACCTTTGCGGCCTCGCTGCCGCGCAACGAAAGAGCGCTGAAATGTCGAATATGATGCG

N L C G L A A A Q R K S A •

GGACAGCCAGATCATGGCGCAAATCAACGACGAGAATCTCGGCTACATGTCCGACATGG

CGCTCGAGCTGGCGCAGATGGCGGACGACTCCGGACTGACGACGCTTGCCTATCTGTTC

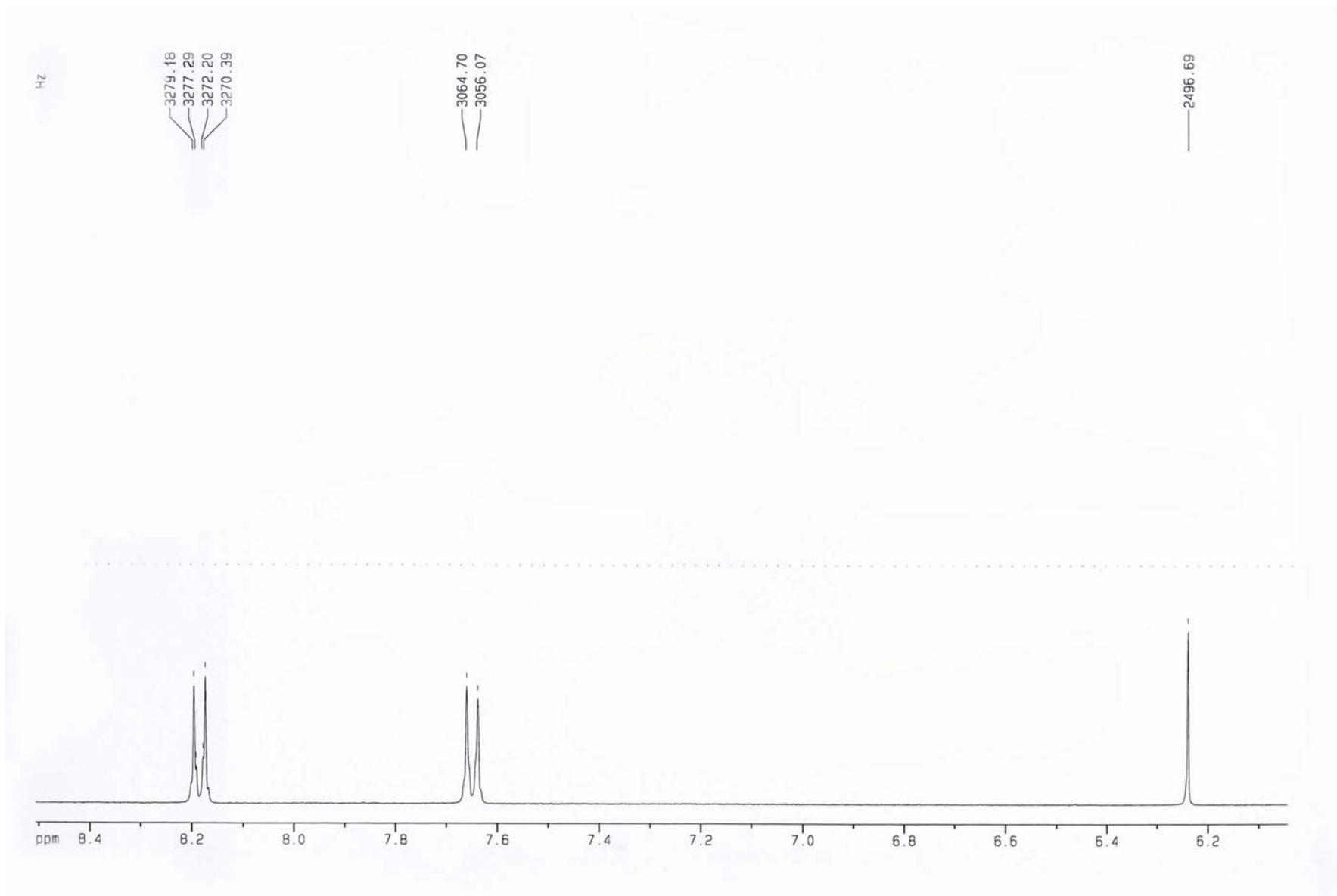
CGGATGGCCGCACTGGAGGCCTCGACGGCAAACAGCGTGCTCGCCGAGCCGGGCGATCT

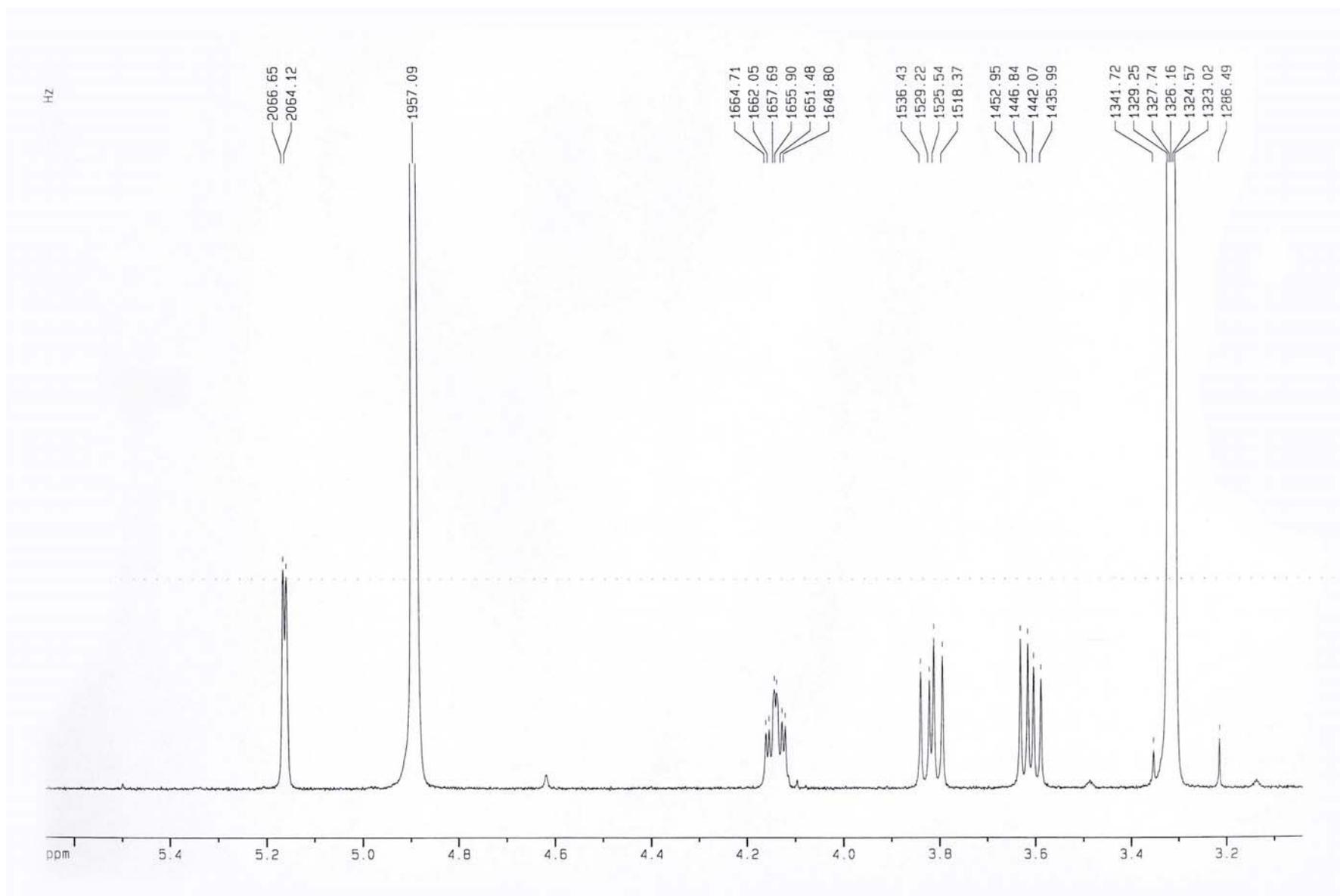
PstI

TCCCCGGCAGATGACGTCGCACTAGACGCAACCTTCTT **CACTTCTTTCATTCCGACCTG**

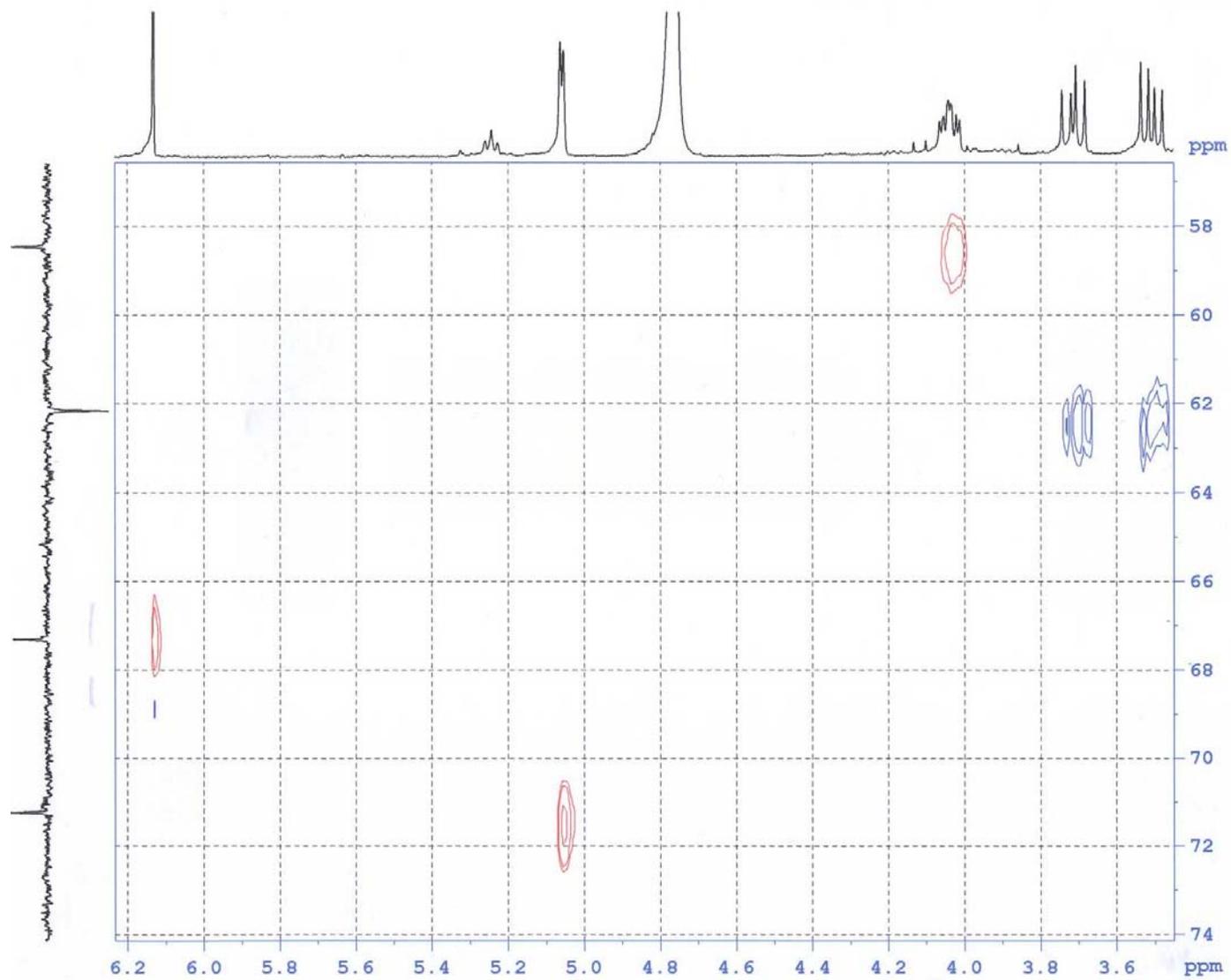
CAGCT

ANEXO 2





ANEXO 3



ANEXO 4

