



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

TESIS DOCTORAL

**IMPORTANCIA DEL PLÁSMIDO pSymB PARA LA TOLERANCIA
DE *Sinorhizobium meliloti* A ESTRÉS ABIÓTICO**

REBECA PÉREZ ARNEDO

Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rebeca Pérez Arnedo
D.L.: GR 2027-2011
ISBN: 978-84-694-1076-9

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**IMPORTANCIA DEL PLÁSMIDO pSymB PARA LA TOLERANCIA
DE *Sinorhizobium meliloti* A ESTRÉS ABIÓTICO**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Ciencias
Biológicas Rebeca Pérez Arnedo para aspirar al Grado de Doctor**

Fdo. Rebeca Pérez Arnedo

VºBº

El Director

Fdo. Juan Sanjuán Pinilla

Doctor en Ciencias Biológicas

Profesor de Investigación del CSIC

Granada, 2010

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Algunos de los resultados de esta Tesis han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

VIII Congreso Nacional de Fijación Biológica de Nitrógeno. Cuernavaca, México, 2008.

VIIth European Nitrogen Fixation Conference. Aarhus, Dinamarca, 2006.

XI Reunion Nacional de Fijación de Nitrógeno. El Escorial, Madrid, 2006.

XXII RELAR. Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Miguel Pereira, Brasil, 2004.

X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. Granada, 2004.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Domínguez-Ferreras, A., R. Pérez-Arnedo, A. Becker, J. Olivares, M. J. Soto, y J. Sanjuán. 2006. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymb for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188:7617-7625.

Domínguez-Ferreras, A., Soto, M. J., Perez-Arnedo, R., Olivares, J., y Sanjuan, J. 2009. Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of alfalfa roots. *J. Bacteriol.* 191: 7490-7499.

*Dijo un sabio a una campesina:
¿Qué darías por saber lo que yo sé?
Respondiendo esta:
Daría más por saber lo que no sabes.*

-Anónimo-

A mis padres.

A Antonio.

ÍNDICE

<u>ÍNDICE</u>	XI
ABREVIATURAS	XXI
ÍNDICE DE TABLAS	XXV
ÍNDICE DE FIGURAS	XXVII
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
I. MECANISMOS DE OSMOADAPTACIÓN EN PROCARIOTAS	3
1. ACUMULACIÓN DE “SAL EN EL CITOPLASMA”	3
2. RESPUESTA A UN CHOQUE HIPEROSMÓTICO	5
2.1. Captación de potasio	5
2.2. Acumulación de solutos compatibles	6
2.2.1. Diferencias principales entre solutos compatibles acumulados por bacterias y arqueas	7
3. DISTRIBUCIÓN DE LOS SOLUTOS COMPATIBLES	8
3.1. Acumulación de aminoácidos como solutos compatibles en organismos procariotas	8
3.2. Acumulación de polioles como solutos compatibles	12
3.3. Acumulación de polioles con enlaces fosfodiéster como solutos compatibles en bacterias hipertermófilas y termófilas	12
3.4. Acumulación de manosilglicerato y manosilglicerámido	13
3.5. Acumulación de glucosilglicerato, glucosil-glucosilglicerato y manosil-glucosilglicerato	14
3.6. Acumulación de bifosfoglicerato cíclico en arqueas metanogénicas	15
3.7. Trehalosa y sacarosa como azúcares osmoprotectores	16
3.7.1. Acumulación de sacarosa	16
3.7.2. Acumulación de trehalosa	16
A. Biosíntesis de trehalosa	16
B. Transporte y utilización de trehalosa	20
B.1. Transporte y utilización de trehalosa en <i>E. coli</i>	21
B.1.1. Regulación del metabolismo de trehalosa en <i>E. coli</i>	23
B.1.2. Caracterización de una trehalasa citoplásmica en <i>E. coli</i>	23

B.2. Utilización de trehalosa en otros organismos	24
B.2.1. Degradación de trehalosa en hongos	24
B.2.2. Trehalosa y trehalasa en plantas	26
II-REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS EN PROCARIOTAS	27
1. FACTORES SIGMA ALTERNATIVOS	27
2. SISTEMAS DE RESPUESTA A ESTRÉS EXTRACITOPLÁSMICO EN <i>E. coli</i>	28
2.1. Sistemas de transducción de señales de dos componentes	29
2.2. Respuesta a estrés extracitoplásmico. Factor de transcripción σ^E	30
2.2.1. Regulación del factor alternativo σ^E en <i>E. coli</i>	30
III. SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>- LEGUMINOSA	33
1. OSMOADAPTACIÓN EN <i>RHIZOBIUM</i>	37
1.1. Osmoprotectores y solutos compatibles en rizobios	37
1.2. Transporte y utilización de trehalosa en <i>S. meliloti</i>	41
1.3. Cambios en las envueltas celulares en rizobios en condiciones de estrés	42
1.4. Factores de transcripción en <i>S. meliloti</i>	43
1.5. Análisis del transcriptoma de <i>S. meliloti</i> en respuesta a un choque osmótico	46
<u>OBJETIVOS</u>	49
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	53
1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	55
2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	60
2.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	60
2.2. Medios de cultivo para <i>Rhizobium</i>	60
2.3. Conservación de cepas bacterianas	62
2.4. Antibióticos	63
3. CONDICIONES DE CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO	63
4. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN CONDICIONES DE LABORATORIO	64
4.1. Conjugaciones biparentales	64
4.2. Conjugaciones triparentales	64
5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA	64

6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD TREHALASA EN <i>S. meliloti</i> 1021	66
7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TREHALOSA	67
8. DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA/SENSIBILIDAD A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	68
9. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	69
10. AISLAMIENTO ADN GENÓMICO TOTAL	70
11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN	71
12. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	72
13. IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	72
13.1. Electroforesis de ADN	72
13.2. Revelado de geles y fotografía	73
13.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción	73
14. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	73
15. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN EN VECTORES DE CLONACIÓN	74
16. TRANSFORMACIÓN CELULAR	75
16.1. Preparación de células competentes	75
16.2. Preparación de células electrocompetentes	75
16.3. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	76
16.4. Electroporación	76
17. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS E HIBRIDACIÓN ("SOUTHERN BLOTTING")	77
17.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon	77
17.2. Marcaje no radioactivo de sondas de ADN	78
17.3. Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactivas	78
18. SECUENCIACIÓN DE ADN DE DOBLE CADENA	80
19. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE ADN Y PROTEÍNAS	80
20. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL	80
20.1. Eliminación del ADN contaminante en preparaciones de ARN. Tratamiento con DNAsa I.	81

21. SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE UNA MUESTRA DE ARN. REACCIÓN DE REVERSOTRANSCRIPCIÓN DEL ARN	82
22. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA. PCR CUANTITATIVA.	83
22.1. Preparación del SYBR-Green I para PCR cuantitativa	84
22.2. Cuantificación de la expresión génica relativa	84
22.2.1. Cálculo de la eficiencia de una PCR	85
22.2.2. Cálculo de las expresiones relativas	86
22.3. Determinación de productos inespecíficos y estructuras secundarias después de la PCR. Análisis de la curva de fusión o “curva de melting”	87
22.4. Oligonucleótidos utilizados para RT-PCR cuantitativa en tiempo real	88
23. ENSAYOS CON PLANTAS	89
23.1. Esterilización de semillas y germinación	89
23.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas	89
23.3. Cultivo axénico de plantas	90
23.4. Medida del grado de infectividad	90
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	91
CAPÍTULO 1: MANIPULACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TREHALOSA POR <i>Sinorhizobium meliloti</i>: EFECTOS SOBRE LA OSMOTOLERANCIA Y LA SIMBIOSIS CON ALFALFA	93
RESULTADOS	93
ANTECEDENTES	
1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD TREHALASA EN <i>S. meliloti</i> 1021	94
2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN SMb20968 DE <i>S. meliloti</i> 1021	96
2.1. Análisis “in silico” del gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i>	96
2.2. Capacidad de osmoadaptación en vida libre del mutante SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021	98
2.3. Papel del gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021 en tolerancia a diferentes estreses abióticos	100
2.4. Capacidad de crecimiento del mutante SMb20968 ⁻ en respuesta a estrés salino en medios que contienen trehalosa	101
2.5. Capacidad de osmoadaptación en vida libre de la cepa 1021 de <i>S. meliloti</i> que sobreexpresa el gen SMb20968	104

2.6. Acumulación de trehalosa en la cepa de <i>S. meliloti</i> 1021 que sobreexpresa el gen SMb20968	106
2.7. Perfil de expresión del gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021	107
2.8. Actividad trehalasa en <i>S. meliloti</i> en condiciones de estrés salino	108
2.9. Comportamiento simbiótico del mutante en el gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021	109
3. AUMENTO DE LA CAPACIDAD DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA Y SU EFECTO SOBRE LA OSMOADAPTACIÓN DE LA BACTERIA.	110
3.1. Capacidad de acumulación de trehalosa y de crecimiento en condiciones de estrés salino de cepas de <i>S. meliloti</i> 1021 que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa	110
DISCUSIÓN	119
ANEXOS	127
Anexo 1. Construcción de un mutante en el gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021	129
Anexo 2. Construcción de los plásmidos pJBotsA/B, pJBotsA, pJBtreY, pJBtreF	132
2.1. Construcción del plásmido pJBotsA/B que sobreexpresa el operón <i>otsAB</i> de <i>M. loti</i> MAFF303099	132
2.2. Construcción de los plásmidos pJBotsA, pJBtreY y pJBtreS	133
2.3. Construcción del plásmido pJBtreF que sobreexpresa el gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021	135
CAPÍTULO 2: IMPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pSymB DE <i>Sinorhizobium meliloti</i> EN OSMOADAPTACIÓN: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES IMPORTANTES PARA TOLERANCIA A ESTRÉS	139
RESULTADOS	
1. VERIFICACIÓN DE LA INDUCIBILIDAD POR CHOQUE OSMÓTICO DE GENES OSMORREGULADOS EN <i>S. meliloti</i> 1021	139
2. PAPEL DE LOS GENES SMb20249 y <i>rpoE5</i> EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO	143
2.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN SMb20249 (<i>ino1</i>) DE <i>S. meliloti</i> 1021	143
2.1.1. Análisis “in silico” del gen SMb20249 implicado en la síntesis del inositol y compuestos derivados en <i>S. meliloti</i> 1021	145
2.1.2. Capacidad de adaptación a estrés osmótico y térmico en vida libre de un mutante <i>ino1</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	147
2.1.3. Importancia del gen <i>ino1</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en la simbiosis con <i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	150
2.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN <i>rpoE5</i> DE <i>S. meliloti</i> 1021	150
2.2.1. Análisis “in silico” del gen <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	150

2.2.2. Capacidad de adaptación a estrés osmótico y térmico de un mutante <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	152
2.2.3. Importancia del gen <i>rpoE5</i> DE <i>S. meliloti</i> 1021 en la simbiosis con <i>Medicago sativa</i>	154
3. IMPLICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS DE <i>S. meliloti</i> EN TOLERANCIA A ESTRÉS OSMÓTICO	154
3.1. Capacidad de osmoadaptación en vida libre de una cepa de <i>S. meliloti</i> curada del plásmido pSymA	155
3.2. Importancia del pSymB para la osmoadaptación de <i>S. meliloti</i> 1021	157
3.3. Infectividad de las cepas RmF514 Y RmF909 en raíces de <i>Medicago sativa</i>	166
4. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES DEL pSymB DE <i>S. meliloti</i> RELACIONADOS CON OSMOADAPTACIÓN	167
4.1. Perfil de expresión de los genes SMb20346, SMb20522 y SMb21407 en condiciones de estrés salino	169
4.2. Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en genes del pSymB de <i>S. meliloti</i>	172
4.2.1. Crecimiento de mutantes derivados de <i>S. meliloti</i> 2011 en medio sólido	172
4.2.2. Crecimiento de mutantes derivados de <i>S. meliloti</i> 2011 en medio líquido	175
4.3. Capacidad de osmoadaptación de mutantes de <i>S. meliloti</i> 2011 portadores de inserciones de miniTn5 en regiones intergénicas	178
5. COMPLEMENTACIÓN GÉNÉTICA DE LA CEPA RmF514	180
5.1. Identificación y caracterización de genes de pSymB implicados en tolerancia a estrés salino	184
6. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES SMb21091 (<i>satM</i>) y SMb21092 DE <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	192
6.1. Análisis “in silico” de los genes SMb21091 (<i>satM</i>) y SMb21092 de <i>S. meliloti</i>	192
6.2. Capacidad de osmoadaptación de mutantes en los genes SMb21091 y SMb21092 de <i>S. meliloti</i>	195
6.3 Importancia del gen SMb21091 (<i>satM</i>) de <i>S. meliloti</i> 1021 para la tolerancia a otros estreses abióticos	198
7. PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN SMb21091 (<i>satM</i>) DE <i>S. meliloti</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO	201
8. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES SMb21091 (<i>satM</i>) y SMb21092 DE <i>S. meliloti</i>	202
9. CAPACIDAD DE NODULACIÓN DE MUTANTES EN LOS GENES <i>satM</i> Y SMb21092 DE <i>S. meliloti</i> EN RAICES DE ALFALFA	205

DISCUSIÓN	207
ANEXOS	219
Anexo 1. Construcción de un mutante en el gen SMb20249 de <i>S. meliloti</i> 1021	221
Anexo 2. Construcción de un mutante en el gen <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	223
Anexo 3. Construcción de los plásmidos pJB7,6-1, pJB7,6-2, pJB5,2 y pJB3,1	225
Anexo 4. Construcción de los clones pJB1,89, pJBlysR, ΔpJB1,89 y pJB1,6	226
Anexo 5. Construcción de mutantes en el gen SMb21091 (<i>satM</i>) de <i>S. meliloti</i> 1021	229
5.1. Obtención del mutante 091 ⁻ a partir del plásmido pCHESI-zKm	229
5.2. Obtención del mutante 091 ⁻ a partir del plásmido pSUP202pol4	231
Anexo 6. Construcción del mutante en el gen SMb21092 (092 ⁻) de <i>S. meliloti</i> 1021	232
Anexo. 7. Construcción de una fusión transcripcional SMb21091 (<i>satM</i>) de <i>S. meliloti</i> 1021 al gen reportero <i>gusA</i>	235
Anexo 8. Construcción de fusiones traduccionales de los genes SMb21091 (<i>satM</i>) y SMb21092 de <i>S. meliloti</i> 1021 al gen <i>phoA</i> de <i>E. coli</i>	236
8.1. Construcción de los plásmidos pUCHlysM y pBBRlysM	236
8.2. Construcción de los plásmidos pUCH092 y pBBR092	238
<u>CONCLUSIONES</u>	240
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	244

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

µg	Microgramos
µl	Microlítros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
A	Absorbancia a la longitud de onda (λ) indicada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BCIP	X-Phos; 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
bv.	Biovariedad
cDNA/ADNc	ADN complementario o ADN de cadena sencilla
cm	Centímetros
C°	Grados centígrados
Ct	Ciclo Umbral
D.O./DO	Densidad óptica medida a la longitud de onda indicada
dATP	Desoxiadenosin trifosfato
dCTP	Desoxicitidin trifosfato
DGP	Diglicerol fosfato
dGTP	Desoxiguanidin trifosfato
DIP	Di- <i>mio</i> -inositol fosfato
DMDIP	Dimanosil-di- <i>mio</i> -inositol fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSP	Dimetil sulfonil propionato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dUTP	Desoxiuridin trifosfato
ECF	Función extracitoplásmica
eds.	Editores
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacárido
et al.	Y colaboradores
g	Gramos

GG	Glucosilglicerato
GGG	Glucosil-glucosilglicerato
GIP	Gliceril- <i>mio</i> -inositol fosfato
Gluc.	Glucosa
Gm	Gentamicina
h	Horas
H₂O DEPC	Agua tratada con Dietilpirocarbonato
K⁺	Iones potasio
Kb	Kilobases
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Km	Kanamicina
KPS	Polisacárido capsular
l	Litros
LPS	Lipopolisacárido
m	Metros
M	Molar
MES	Ácido morfolinoetanosulfónico
mg	Miligramos
MG	Manosilglicerato
MGA	Manosilglicerámido
MGG	Manosil-glucosilglicerato
min	Minutos
ml	Mililitros
MM	Medio mínimo
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N₂	Nitrógeno molecular
NAD	Nicotamida adenin dinucleótido
NAGGN	N-acetil glutaminil glutamina amida
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nmol	Nanomoles
NPG	Nitrophenyl Glucurónido
Nx	Nalidíxico
OMP	Porinas
ORF	Marco de lectura abierta

pb	Pares de bases
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	Tampón-Ácido piperacín-1,4-bis (2-etanosulfónico)
pmol	Picomoles
NPG	nitrofenil- β -D-glucurónido
pp	Páginas
prot	Proteína
pSym	Plásmido simbiótico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR en transcripción inversa
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato sódico
Sm	Estreptomicina
sp	Especie
Spc	Espectomicina
TBE	Tampón Tris Borato EDTA
Tc	Tetraciclina
Tm	Temperatura de fusión
Tp	Trimetropina
UDP	Uridín difosfato
ufc	Unidades formadoras de colonias
V	Voltios
V_{max}	Velocidad máxima
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónido
β-Gluc	Actividad glucuronidasa

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1	Propiedades bioquímicas de TreA y TreF de <i>E. coli</i>	24
Tabla M.1	Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	55
Tabla M.2	Plásmidos utilizados en este trabajo	57
Tabla M.3	Antibióticos utilizados en este trabajo	63
Tabla M.4	Determinación de la expresión relativa de los genes SMb20537 y SMc02163	87
Tabla M.5	Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR cuantitativa	88
Tabla 1.1	Identidad de secuencia de SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021 con otras proteínas bacterianas	96
Tabla 2.1	Genes seleccionados para verificar su expresión diferencial por choque osmótico mediante PCR cuantitativa	140
Tabla 2.2	Cuantificación por RT-PCR de la expresión diferencial de un grupo de genes de <i>S. meliloti</i> 1021 tras un choque salino	141
Tabla 2.3	Comparación de la secuencia del producto de SMb20249 de <i>S. meliloti</i> 1021 con proteínas de otras bacterias	146
Tabla 2.4	Conjunto de genes de <i>S. meliloti</i> en los que se dispuso de mutantes para su estudio en condiciones de estrés osmótico	169
Tabla 2.5	Mutantes de <i>S. meliloti</i> 2011 portadores de miniTn5 insertado en regiones intergénicas (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006)	178
Tabla 2.6	Genes del pSymB de <i>S. meliloti</i> localizados en el fragmento de 7,6 Kb	185
Tabla 2.7	Similitud del producto del gen SMb21091 de <i>S. meliloti</i> 1021 con proteínas de otras bacterias	193
Tabla 2.8	Homología de la proteína SMb21092 de <i>S. meliloti</i> 1021 con proteínas de otras bacterias	195

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Solutos compatibles clasificados por su estructura química e identificados en organismos procariotas	9
Figura I.2	Estructura de algunos aminoácidos y derivados, acumulados como solutos compatibles en organismos procariotas	11
Figura I.3	Estructura de los principales polioles con enlaces fosfodiéster acumulados como solutos compatibles en organismos hipertermófilos y termófilos	13
Figura I.4	Estructura de los solutos compatibles manosilglicerato y manosilglicerámido	14
Figura I.5	Estructura del glucosilglicerato (GG) y sus derivados manosilglucosilglicerato (MGG) y glucosil-glucosilglicerato (GGG)	15
Figura I.6	Representación de las cinco rutas biosintéticas de trehalosa	19
Figura I.7	Distribución de las enzimas de las rutas de síntesis de trehalosa conocidas en organismos eucariotas y procariotas	19
Figura I.8	Principales rutas de degradación de trehalosa caracterizadas en distintos organismos	20
Figura I.9	Modelo de transporte y utilización de trehalosa en <i>E. coli</i>	22
Figura I.10	Modelo de asimilación de trehalosa en <i>S. cerevisiae</i>	25
Figura I.11	Representación esquemática de los sistemas de respuesta a estrés extracitoplásmico	31
Figura I.12	Respuesta a estrés extracitoplásmico mediada por el factor alternativo σ^E en <i>E. coli</i>	32
Figura I.13	Representación esquemática del proceso de nodulación	36
Figura I.14	Modelo de activación de RpoE2 en respuesta a estrés propuesto para <i>S. meliloti</i> 1021	46
Figura 1.1	Actividad trehalasa en <i>S. meliloti</i> 1021 utilizando los protocolos de Horlacher (1996) y Dardanelli (2000)	95
Figura 1.2	Representación de la región génica de SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021	97
Figura 1.3	Curvas de crecimiento de un mutante SMb20968 ⁻ de <i>S. meliloti</i> en TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	98
Figura 1.4	Curvas de crecimiento de un mutante en el gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021 tras un choque salino en MM	99
Figura 1.5	Crecimiento del mutante SMb20968 ⁻ de <i>S. meliloti</i> 1021 en TY sólido adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl y 700 mM de sacarosa	100
Figura 1.6	Crecimiento del mutante SMb20968 de <i>S. meliloti</i> en TY a temperatura supraóptima y a pH ácido	101
Figura 1.7	Curvas de crecimiento de un mutante SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021 en MM adicionado de 5 mM o 50 mM de trehalosa en presencia o ausencia de 400 mM de NaCl	102
Figura 1.8	Crecimiento del mutante SMb20968 ⁻ de <i>S. meliloti</i> en MM sólido en condiciones de estrés salino en presencia de trehalosa en el medio y como única fuente de carbono	103
Figura 1.9	Curvas de crecimiento de la cepa 1021(pJBtreF) en MM adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	104
Figura 1.10	Curvas de crecimiento de la cepa 1021 (pJBtreF) tras un choque salino en MM	105
Figura 1.11	Crecimiento de la cepa de <i>S. meliloti</i> 1021 que sobreexpresa el gen SMb20968 en MM adicionado de 400 mM de NaCl	105

Figura 1.12	Trehalosa acumulada en la cepa que sobreexpresa el gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021 tras un choque salino con 300 mM de NaCl	106
Figura 1.13	Expresión del gen SMb20968 a lo largo de la curva de crecimiento de <i>S. meliloti</i> 1021 tras la adición de 400 mM de NaCl en MM	107
Figura 1.14	Actividad trehalasa en un mutante SMb20968 ⁻ de <i>S. meliloti</i> y en la cepa parental 1021 en MM a distintos tiempos tras un choque de 400 mM de NaCl	108
Figura 1.15	Cinéticas de nodulación del mutante SMb20968 de <i>S. meliloti</i> y de la cepa que sobreexpresa el gen SMb20968	109
Figura 1.16	Curvas de crecimiento de cepas de <i>S. meliloti</i> que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa en MM adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	111
Figura 1.17	Crecimiento de cepas de <i>S. meliloti</i> que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa en MM sólido adicionado de 400 mM de NaCl	112
Figura 1.18	Trehalosa acumulada en respuesta a la adición de 300 mM de NaCl en MM por cepas derivadas <i>S. meliloti</i> 1021 que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa	113
Figura 1.19	Curvas de crecimiento de la cepa 1021 (pJBotsA) tras un choque a distintas concentraciones de NaCl en MM	113
Figura 1.20	Trehalosa acumulada en las cepas de <i>S. meliloti</i> 1021 que sobreexpresan el gen <i>otsA</i> en respuesta a un choque con 400 mM de NaCl en medio TY	114
Figura 1.21	Crecimiento de las cepa 1021(pJBotsA) en TY sólido adicionado de 400 mM de NaCl	115
Figura 1.22	Curvas de crecimiento de la cepa 1021(pJBotsA) tras un choque salino en TY	115
Figura 1.23	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>S. meliloti</i> 1021 que sobreexpresan genes de la ruta TPS/TPP en medio TY adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl	117
Figura 1.24	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>M. loti</i> MAFF303099 que sobreexpresan la ruta TPS/TPP en TY adicionado de 50 mM y 75 mM de NaCl	118
Figura 1.25	Esquema de las distintas etapas para la construcción <i>in vitro</i> de una mutación en el gen SMb20968	130
Figura 1.26	Esquema de la construcción del mutante en el gen SMb20968 de <i>S. meliloti</i> 1021	131
Figura 1.27	Comprobación de mutantes SMb20968 ⁻ de <i>S. meliloti</i>	132
Figura 1.28	Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pJBotsA/B, pJBotsA, pJBtreY y pJBtreS	134
Figura 1.29	Mapa de los plásmidos pGtreF y pJBtreF	136
Figura 2.1	Perfil de expresión del gen SMb20651 de <i>S. meliloti</i> 1021 tras un choque salino con 400 mM de NaCl en MM	142
Figura 2.2	Ruta de síntesis del inositol	144
Figura 2.3	Representación de la región genética de <i>ino1</i> en rizobios	146
Figura 2.4.	Curvas de crecimiento de un mutante <i>ino1</i> de <i>S. meliloti</i> en MM adicionado de 700 mM de sacarosa, 300 mM y 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	148
Figura 2.5	Curvas de crecimiento de un mutante en el gen <i>ino1</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 tras un choque salino en MM	149
Figura 2.6	Curvas de crecimiento de un mutante <i>ino1</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en MM y a temperatura supraóptima	149

Figura 2.7	Cinética de nodulación del mutante <i>ino1</i> en raíces de <i>Medicago sativa</i> , en comparación con la cepa parental <i>S. meliloti</i> 1021	150
Figura 2.8	Esquema de la localización de genes <i>rpoE</i> en el genoma de <i>S. meliloti</i> 1021	151
Figura 2.9	Curvas de crecimiento de un mutante <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> en MM adicionado de 300 mM y 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	152
Figura 2.10	Curvas de crecimiento de un mutante en el gen <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 tras un choque salino en MM	153
Figura 2.11	Curvas de crecimiento de un mutante <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 a 30°C y a temperatura supraóptima	153
Figura 2.12	Cinética de nodulación del mutante <i>rpoE5</i> en raíces de <i>Medicago sativa</i>	154
Figura 2.13	Distribución en replicones (pSymA, pSymB y cromosoma) de genes osmorregulados de <i>S. meliloti</i> 1021	155
Figura 2.14	Curvas de crecimiento de la cepa A818 de <i>S. meliloti</i> en MM y en TY adicionados de distintas concentraciones de NaCl y sacarosa desde el inicio del cultivo	156
Figura 2.15	Representación de diferentes versiones delecionadas del plásmido pSymB presentes en varias cepas derivadas de <i>S. meliloti</i> 1021	158
Figura 2.16	Curvas de crecimiento en MM de las cepas Rm5378, RmG506, RmF728, RmF680, RmF666, RmF693 y RmF909 derivadas de <i>S. meliloti</i> 1021	159
Figura 2.17	Curvas de crecimiento en medio TY de las cepas RmF666, RmF693 y RmF909, RmF514 y RmF117 en relación a la cepa parental <i>S. meliloti</i> 1021	160
Figura 2.18	Esquema representativo de las regiones de pSymB delecionadas en cada una de las cepas derivadas de <i>S. meliloti</i> 1021 utilizadas en estudios de osmoadaptación	161
Figura 2.19	Curvas de crecimiento de las cepas RmF666, RmF693, RmF514 y RmF909 en medio TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	161
Figura 2.20	Curvas de crecimiento de las cepas RmF666, RmF693, RmF514 y RmF909 en medio TY adicionado de 500 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	162
Figura 2.21	Curvas de crecimiento de las cepas RmF666, RmF693, RmF514 y RmF909 en medio TY adicionado de 700 mM de sacarosa desde el inicio del cultivo	162
Figura 2.22	Curvas de crecimiento de las cepas RmF514 y RmF909 en medio TY y TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio de cultivo	163
Figura 2.23	Crecimiento de las cepas RmF514 y RmF909 en respuesta a un choque salino	164
Figura 2.24	Crecimiento de las cepas RmF514 y RmF909 en medio sólido TY adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl y 500mM y 700 mM de sacarosa	165
Figura 2.25	Esquema representativo de las regiones de pSymB faltantes en las cepas RmF514 y RmF909	166
Figura 2.26	Cinéticas de nodulación de las cepas RmF909 y RmF514	166
Figura 2.27	Estudio de la expresión de los genes SMb20522, SMb20346 y SMb21407 a distintos tiempos tras un choque salino	171
Figura 2.28	Crecimiento relativo de mutantes derivados de <i>S. meliloti</i> 2011 en MM sólido adicionado de 400 mM de NaCl y 500 mM de sacarosa	173
Figura 2.29	Crecimiento relativo de mutantes derivados de <i>S. meliloti</i> 2011 en MM	174

	sólido adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl y 500 mM de sacarosa	
Figura 2.30	Crecimiento de los mutantes SMb20345 ⁻ , SMb20487 ⁻ , SMb20968 ⁻ , SMb21407 ⁻ y SMb20537 ⁻ en MM sólido adicionado de 300 mM y 400 mM de NaCl y 500 mM de sacarosa	175
Figura 2.31	Crecimiento de cepas SMb20345 ⁻ , SMb20522 ⁻ y SMb21537 ⁻ en MM y MM adicionado de 300 mM de NaCl	176
Figura 2.32	Crecimiento de las cepas SMb20487 ⁻ , SMb21407 ⁻ , SMb20541 ⁻ y SMb20968 ⁻ en MM y MM adicionado de 400 mM de NaCl	177
Figura 2.33	Crecimiento de mutantes portadores de miniTn5 en regiones intergénicas.	179
Figura 2.34	Colonias transconjugantes de RmF514	180
Figura 2.35	Análisis de los perfiles de restricción <i>EcoRI</i> de los cósmidos de transconjugantes de la cepa RmF514 que recuperaron la capacidad de crecimiento en NaCl	181
Figura 2.36	Hibridaciones de los ADNs genómicos de las cepas silvestres GR4 y 1021 y las cepas mutantes RmF909 y RmF514 digeridos con <i>EcoRI</i>	182
Figura 2.37	Comprobación de la recuperación del crecimiento de la cepa RmF514 en condiciones de elevada salinidad por cósmidos del grupo 1	183
Figura 2.38	Esquema de la región génica común a los cósmidos 3, 15 y 5	184
Figura 2.39	Mapa físico de la región génica común a todos los cósmidos y conjunto de genes del pSymB de <i>S. meliloti</i> que forman parte de ella	185
Figura 2.40	Subclonación del fragmento de 7,6 Kb y derivados del mismo	186
Figura 2.41	Recuperación del crecimiento de RmF514 en altas concentraciones de NaCl por las construcciones pJB7,6-1, pJB7,6-2 y pJB3,1	186
Figura 2.42	Representación esquemática de las construcciones pJB1,89 y pJBlysR	187
Figura 2.43	Recuperación del crecimiento de RmF514 en altas concentraciones de NaCl por los plásmidos pJB3,1 y pJB1,89	188
Figura 2.44	Curvas de crecimiento de las cepas RmF514 (pJB3,1), RmF514 (pJB1,89) y RmF514 (pJBlysR) en medio TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	189
Figura 2.45	Curvas de crecimiento de las cepas RmF514 (pJB3,1), RmF514 (pJB1,89) y RmF514 (pJBlysR) en medio TY adicionado de 500 mM de NaCl desde el inicio del cultivo	190
Figura 2.46	Representación esquemática de las construcciones Δ pJB1,89 y pJB1,6	191
Figura 2.47	Recuperación del crecimiento de RmF514 en altas concentraciones de NaCl por los plásmidos pJB1,89 y pJB1,6	192
Figura 2.48	Análisis filogenético de SatM	194
Figura 2.49	Curvas de crecimiento en TY adicionado de 400 mM de NaCl de los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 en los genes SMb21091 (091 ⁻) y SMb21092 (092 ⁻)	196
Figura 2.50	Crecimiento de las cepas 091 ⁻ y 092 ⁻ de <i>S. meliloti</i> en medio TY adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl	197
Figura 2.51	Crecimiento de las cepas 091 ⁻ y 092 ⁻ de <i>S. meliloti</i> en medio TY adicionado de 700 mM de sacarosa	197
Figura 2.52	Recuperación del crecimiento del mutante 091 ⁻ (pCH091) en altas concentraciones de NaCl por la construcción pJB1,6	198
Figura 2.53	Crecimiento de cepas 091 ⁻ y 091 ⁻ c de <i>S. meliloti</i> 1021 en TY	199

	adicionado de distintas concentraciones de LiCl	
Figura 2.54	Crecimiento de las cepas 091 ⁻ (<i>satM</i>) y 091 ^c de <i>S. meliloti</i> 1021 a temperaturas no óptimas	200
Figura 2.55	Crecimiento de las cepas 091 ⁻ y 091 ^c de <i>S. meliloti</i> 1021 en TY a pH ácido y alcalino	200
Figura 2.56	Sensibilidad del mutante 091 ⁻ y el mutante complementado (091 ^c) a H ₂ O ₂	201
Figura 2.57	Expresión de la fusión transcripcional SMb21091:: <i>uidA</i> (p53lysM) en <i>S. meliloti</i> 1021 en medio TY en presencia y ausencia de 400 mM de NaCl	202
Figura 2.58	Representación esquemática de la secuencia del péptido señal en una lipoproteína	203
Figura 2.59	Actividad PhoA de la fusiones traduccionales pUCHlysM y pUCH092 en <i>E. coli</i> CC118	204
Figura 2.60	Actividad PhoA de las fusiones traduccionales pBBRlysM y pBBR092 en <i>S. meliloti</i> 8002	205
Figura 2.61	Cinéticas de nodulación de los mutantes <i>satM</i> (091 ⁻ -pCH091) y SMb21092 ⁻ de <i>S. meliloti</i> 1021	206
Figura 2.62	Reacción de la lisozima en el peptidoglicano bacteriano	216
Figura 2.63	Reacción enzimática catalizada por una transglicosilasa lítica. Formación del ácido 1,6-anhidromurámico	217
Figura 2.64	Representación esquemática de la construcción del mutante en el gen SMb20249 de <i>S. meliloti</i> 1021	222
Figura 2.65	Comprobación de mutaciones en el gen SMb20249 de <i>S. meliloti</i> 1021	223
Figura 2.66	Representación esquemática de la construcción del mutante <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	224
Figura 2.67	Comprobación de la mutación de <i>rpoE5</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	225
Figura 2.68	Representación esquemática de los plásmidos pJB7,6-1, pJB7,6-2, pJB5,2 y pJB3,1	226
Figura 2.69	Representación esquemática de la construcción de los clones pJB1,89, pJBlysR, ΔpJB1,89 y pJB1,6	228
Figura 2.70	Representación esquemática de la construcción del plásmido pCH091	230
Figura 2.71	Comprobación de los mutantes en el gen <i>satM</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	230
Figura 2.72	Comprobación de los mutantes en el gen <i>satM</i> de <i>S. meliloti</i>	231
Figura 2.73	Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pG21092, pG21092SS y pS21092SS	233
Figura 2.74	Representación esquemática de la construcción del mutante 092 ⁻ de <i>S. meliloti</i> 1021	234
Figura 2.75	Comprobación de mutantes 092 ⁻ de <i>S. meliloti</i> 1021	234
Figura 2.76	Representación esquemática de la construcción p53lysM que contiene la fusión transcripcional <i>satM</i> :: <i>uidA</i>	235
Figura 2.77	Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pUCHlysM y pBBRlysM. Mapas de los vectores pUCH218 y pBBRphoA	237
Figura 2.78	Representación esquemática del fragmento amplificado (537 pb) del gen SMb21092 para la construcción de los plásmidos pUCH092 y pBBR092. Mapas de los vectores pUCH218 y pBBRphoA	239

INTRODUCCIÓN

I. MECANISMOS DE OSMOADAPTACIÓN EN PROCARIOTAS.

La presión osmótica del medio es uno de los parámetros físicos que determinan la capacidad de los organismos para crecer y proliferar en un determinado ambiente. Las células bacterianas mantienen una presión osmótica intracelular superior a la del medio externo, lo que unido a la presencia de una pared semirrígida que rodea a la membrana celular, supone que cuando el agua difunde al interior, la membrana se expande hasta ejercer una presión sobre la pared que se conoce como presión de turgor. La disponibilidad de agua se expresa en términos físicos como la actividad de agua y es un requisito imprescindible para la vida. Ante una membrana semipermeable como es la membrana citoplasmática, el agua difunde desde una región con alta concentración de agua (baja concentración de solutos) hasta una región con menor concentración (alta concentración de solutos) por el proceso denominado ósmosis. Sin embargo, una disminución de la disponibilidad de agua como consecuencia de la exposición a ambientes hipersalinos, conlleva una pérdida hídrica y una caída de la presión de turgor en las células (Poolman y Glaesker, 1998). La salida del agua puede llegar a provocar la retracción en la membrana citoplásmica de la pared celular, dando lugar a un proceso conocido como *plasmolisis*. Si el aumento de la osmolaridad del medio no es demasiado severo, la plasmolisis es transitoria y después de un corto periodo de tiempo, el volumen citoplásmico se recupera como resultado de la adaptación osmótica de la célula.

Los microorganismos han desarrollado dos estrategias principales para mantener el turgor celular y evitar la pérdida de agua ocasionada por el aumento de la osmolaridad del medio externo; una de ellas consiste en la acumulación de “sal en el citoplasma” y la otra en la acumulación de moléculas orgánicas de bajo peso molecular conocidas como solutos compatibles (Galinski, 1995; da Costa *et al.*, 1998; Roesser y Muller, 2001; Sleator y Hill, 2002; Sleator y Hill, 2002).

1. ACUMULACIÓN DE “SAL EN EL CITOPLASMA”.

La estrategia de adaptación a un choque hiperosmótico conocida como “sal en el citoplasma” consiste en la acumulación de iones inorgánicos del medio, principalmente potasio (K^+), hasta niveles citoplásmicos similares a los extracelulares. Se trata de un mecanismo que está restringido a halófilos extremos como arqueas de

la familia *Halobacteriaceae*, entre las cuales estarían las bacterias de los géneros *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium*, y *Natronococcus*. Esta estrategia puede encontrarse también en eubacterias halófilas del orden *Haloanaerobiales* y en la bacteria *Salinibacter ruber* (Oren, 2008; Sleator y Hill, 2002). El K^+ es el principal catión acumulado y, como consecuencia, el citoplasma de estos organismos presenta concentraciones iónicas muy elevadas, que requieren adaptaciones estructurales.

Por otro lado, dado que la respuesta en condiciones de elevada osmolaridad ha sido estudiada en detalle en bacterias como *E. coli* y *B. subtilis*, poco se sabe sobre los procesos de osmoadaptación y osmorregulación en arqueas. La mayoría de estos organismos son extremófilos y muchos de ellos se caracterizan por vivir en ambientes de elevadas temperaturas y con altas concentraciones de sal. Sin embargo, algunos de ellos utilizan las mismas estrategias generales que eubacterias y organismos eucariotas para adaptarse a estas condiciones. Aunque en la mayoría de arqueas no se ha detectado un sistema de transporte Kdp y su composición lipídica en las membranas es diferente, algunos halófilos extremos como *Halobacterium*, bombean grandes cantidades de potasio hacia el interior celular, hasta tal punto que la concentración dentro de la célula puede llegar a ser varias veces superior al sodio extracelular. La pared celular de *Halobacterium* contiene una glicoproteína estabilizada por iones sodio, que es fundamental para mantener la integridad celular, por lo que cuando escasea el sodio la célula simplemente se lisa. Esto es debido a la presencia de enormes cantidades de aminoácidos con carga negativa, como son el aspartato y el glutamato, en la mencionada glicoproteína de superficie. Cuando hay suficiente sodio, las cargas negativas de los grupos carboxilos están neutralizadas por este catión, pero cuando es insuficiente la repulsión electrostática de las cargas negativas conduce a la lisis celular. Al igual que las proteínas de las paredes celulares, las proteínas citoplásmicas de estos halófilos son también altamente ácidas y requieren potasio para la actividad en lugar de sodio, lo cual no es sorprendente si se tiene en cuenta que el K^+ es el catión predominante en las células de estas arqueas. Además, las proteínas citoplásmicas contienen muy baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos como lisina, en comparación con bacterias no halófilas. Esto también tiene sentido, ya que las proteínas muy polares en un medio muy iónico tienden a permanecer en solución, mientras que las no polares tienden a agruparse y perder actividad. Por todo ello, es bastante evidente que las arqueas halófilas extremas están altamente adaptadas a hábitat salinos. Los componentes celulares que están expuestos hacia el exterior celular requieren sodio, mientras que los que están expuestos hacia el interior

requieren potasio. Con la excepción de unas pocas eubacterias halófilas extremas, que también utilizan el potasio como osmolito, en ningún otro grupo se da esta peculiaridad de tan alto requerimiento de cationes para el mantenimiento de la actividad biológica (Madigan *et al.*, 2003)

2. RESPUESTA A UN CHOQUE HIPEROSMÓTICO.

2.1. Captación de potasio.

La respuesta más temprana a un choque hiperosmótico tanto en arqueas como en eubacterias, es la estimulación de la captación de K^+ considerada como la primera fase de la osmoadaptación celular seguida de la acumulación de osmolitos orgánicos. Los sistemas de transporte que llevan a cabo la acumulación de potasio se han estudiado en detalle en bacterias como *E. coli* (Epstein, 2003) y *B. subtilis* (Holtmann *et al.*, 2003). En *E. coli* se ha descrito la existencia de cuatro sistemas constitutivos de transporte de potasio de baja afinidad, TrkG, TrkH, Kup y TrkF, además de un sistema inducible de alta afinidad, Kdp. Trk tiene una afinidad media o baja por dicho catión y responde principalmente ante un estrés hiperosmótico a pH neutro o ligeramente alcalino y cuando la concentración de K^+ es >1 mM, siendo en estas condiciones el sistema predominante de captación de K^+ . Este sistema es la suma de dos mecanismos TrkH y TrkG, codificados por conjuntos de genes de expresión constitutiva que se encuentran dispersos por el cromosoma. Ambos pertenecen a una superfamilia de transportadores de potasio con miembros en plantas, hongos, bacterias y arqueas. Kup (conocido anteriormente como TrkD), es un sistema de baja afinidad constituido por un único componente. En *E. coli* es el principal responsable de la captación de potasio en condiciones de estrés hiperosmótico a un pH de 5,5, cuando la actividad de Trk es insuficiente y Kdp no se encuentra inducido. Mientras Trk funciona a pH neutro o alcalino, Kup se vuelve importante a bajo pH actuando como un simportador de potasio y protones (Sleator y Hill, 2002). Por último, el sistema Kdp es un transportador altamente específico para potasio y ampliamente distribuido en bacterias (Durell *et al.*, 2000). Se trata de un miembro de la familia de ATPasas de tipo P en las que la hidrólisis de ATP proporciona la energía necesaria para impulsar el transporte de cationes. El sistema Kdp está formado por varias subunidades asociadas a la membrana citoplasmática, codificadas por el operón *kdpFABCDE*. Este operón codifica además el sistema regulador de dos componentes KdpDE, en el que la subunidad KdpD actúa como una quinasa sensora y KdpE es el

activador transcripcional. Kdp, por tanto, es un sistema osmóticamente inducible, capaz de transportar K^+ a muy bajas concentraciones de este catión. Además de intervenir en la osmoprotección de la célula, su principal función es el mantenimiento de la homeostasis del potasio a concentraciones limitantes de K^+ .

En conclusión, tanto en bacterias gram negativas como en bacterias gram positivas, la acumulación de potasio inducida por estrés osmótico constituye una fase inicial del proceso de osmoadaptación y está mediada principalmente por la rápida activación de sistemas de alta y baja afinidad. Pero no todo el potasio acumulado es osmóticamente activo, es decir, sólo una fracción de la concentración total de potasio, cuya carga se encuentra equilibrada por otras pequeñas moléculas, contribuye a la actividad osmótica. En *E. coli*, para recuperar el equilibrio iónico como consecuencia de la captación del K^+ tras un choque hiperosmótico, se produce la acumulación de glutamato. Esta molécula comienza a acumularse desde el primer minuto después del choque osmótico y es dependiente del K^+ . Se estima que dicha acumulación es consecuencia de la reducción de la utilización del glutamato para la síntesis de otros compuestos nitrogenados (McLaggan *et al.*, 1994).

2.2. Acumulación de solutos compatibles.

Dado que elevadas concentraciones intracelulares de K^+ tienen efectos negativos sobre las funciones celulares, la captación de potasio es una respuesta inadecuada para la adaptación a elevada salinidad durante periodos prolongados, por lo que transcurrido un tiempo, es necesaria una segunda fase de adaptación que implica la acumulación de solutos compatibles, bien por síntesis “de novo” o por transporte (Wood *et al.*, 2001).

Los solutos compatibles son moléculas orgánicas altamente solubles y de bajo peso molecular que se caracterizan por no interferir con el metabolismo central o el desarrollo de los procesos celulares vitales incluso cuando se acumulan a concentraciones elevadas (Brown, 1976). La acumulación de solutos compatibles es un fenómeno que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y está evolutivamente conservado en los tres dominios (Roberts, 2000). Además de su papel osmoprotector, estos compuestos pueden tener otras funciones en la célula, como constituir importantes reservas de carbono y nitrógeno y actuar por tanto como sistemas de almacenamiento de nutrientes y energía. Muchos de ellos, además, son efectivos estabilizadores enzimáticos y proporcionan también protección frente a altas

temperaturas, ciclos de congelación y descongelación, desecación y estrés oxidativo (Welsh, 2000).

Los solutos compatibles pueden ser sintetizados directamente por el microorganismo o bien tomados del medio externo, previo a su acumulación intracelular. Todas estas sustancias son muy solubles en agua y se trata de azúcares (y azúcares derivados), alcoholes (y alcoholes derivados) y aminoácidos (y aminoácidos derivados). La mayoría de los organismos acumulan una mezcla de solutos compatibles en respuesta a un estrés hiperosmótico, cuya composición depende del organismo, de la fase de crecimiento, de las condiciones fisiológicas de la célula y de la composición del medio de cultivo (Galinski y Trüper, 1999).

Los osmolitos orgánicos pueden clasificarse en tres categorías en función de sus propiedades químicas: solutos compatibles con carga neutra neta, no cargados y solutos compatibles cargados negativamente (Roberts, 2005). Algunos de estos compuestos vienen representados en la figura I.1 y se han detectado en muchos microorganismos, como son el caso de la trehalosa, glicina betaína y el α -glutamato, mientras que otros tienen una distribución más restringida. Los polioles, por ejemplo, se encuentran ampliamente distribuidos en hongos y algas, pero muy raramente en procariontes. La ectoína e hidroxiectoína son ejemplos de solutos compatibles encontrados sólo en eubacterias (Roberts, 2000; Santos y da Costa, 2002).

2.2.1. Diferencias principales entre solutos compatibles acumulados por bacterias y arqueas.

A diferencia de eubacterias, la mayoría de las arqueas que han sido estudiadas, contienen altas concentraciones intracelulares de cationes inorgánicos (principalmente de K^+) y muchas de las proteínas tanto de arqueas halófilas como no halófilas, son ricas en aminoácidos ácidos dando lugar a una carga neta negativa. En *Methanohalophilus portucalensis*, el K^+ intracelular varía con la concentración externa de NaCl y el potasio puede ser considerado como un osmolito principal en esta bacteria (Roberts, 2000). Sin embargo, en la mayoría de estos organismos también se ha determinado la acumulación de solutos compatibles de una forma similar a eubacterias y organismos eucariotas. La diferencia reside en que la mayoría de los solutos de arqueas son compuestos aniónicos, es decir, están cargados negativamente por la adición de grupos fosfato, carboxilato y sulfato (algunos de ellos están representados en la figura I.1). Aunque también existen algunas excepciones,

como son los solutos α -glutamato y glicina betaína, que se han detectado y se consideran osmolitos tanto en eubacterias como en arqueas.

Algunas arqueas a menudo utilizan derivados aniónicos de solutos compatibles de eubacterias y eucariotas, por ejemplo la trehalosa, en bacterias cuyo derivado cargado negativamente, la 2-sulfotrehalosa, ha sido detectado como osmolito en los halófilos *Natronococcus occultis* y *Natronobacterium* spp. También el mio-inositol, un osmolito de plantas y mamíferos, cuyo derivado aniónico, el di-mio-inositol fosfato (DIP) es el principal soluto compatible de algunas arqueas y bacterias termófilas e hipertermófilas. Una posible explicación para la preferencia de este tipo de bacterias por acumular solutos aniónicos, puede deberse a su necesidad de equilibrar la alta concentración intracelular de cationes inorgánicos, en especial K^+ (Roeßler y Müller, 2001).

3. DISTRIBUCIÓN DE LOS SOLUTOS COMPATIBLES.

3.1 Acumulación de aminoácidos como solutos compatibles en organismos procariotas.

Salvo algunas excepciones, la neutralización de K^+ es producida por la acumulación de aniones orgánicos, mayoritariamente aminoácidos y derivados, como son principalmente el **α -glutamato** y sus isómeros, que pueden ser sintetizados internamente o capturados del medio externo. En general, la combinación de K^+ y la acumulación de glutamato alcanza un papel fisiológico clave para la activación del proceso de osmoadaptación (da Costa *et al.*, 1998). El **β -glutamato**, un isómero muy poco frecuente, ha sido identificado en bacterias marinas y algunas arqueas metanogénicas. En bacterias como *P. mobilis* y *Aquifex pyrophilus* se ha visto que acumulan ambos isómeros dependiendo de las máximas concentraciones de sal toleradas (Empadinhas y da Costa, 2008).

Otros osmolitos como la **alanina**, **glutamina** y **prolina** (Figura 2) se consideran los solutos compatibles de muchos organismos. Algunas bacterias gram-positivas pueden acumular alanina y glutamina en bajas concentraciones y prolina en concentraciones muy altas en condiciones de estrés salino. La capacidad osmoprotectora de la prolina está ampliamente distribuida en muchas bacterias y pueden acumularla (por síntesis o transporte) a concentraciones de orden molar, pudiendo llegar a representar hasta el 20% del peso seco de los organismos que la acumulan.

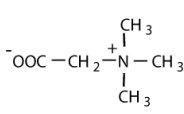
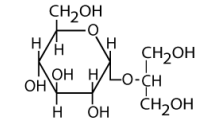
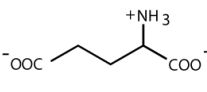
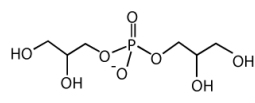
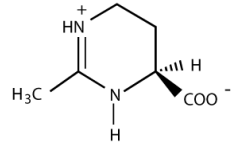
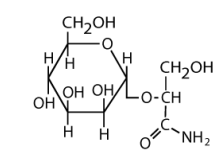
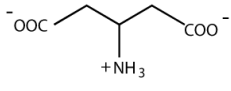
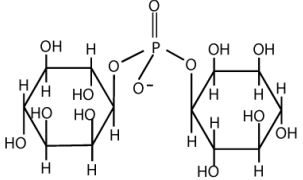
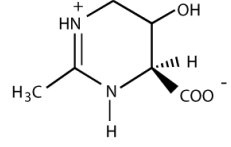
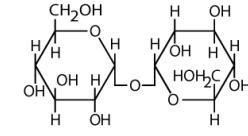
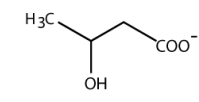
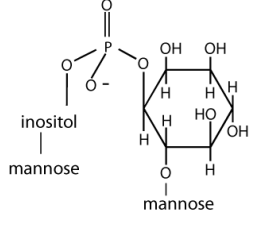
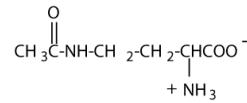
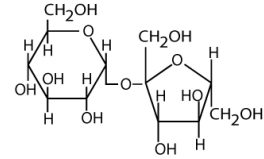
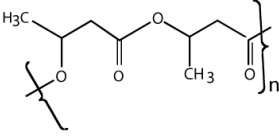
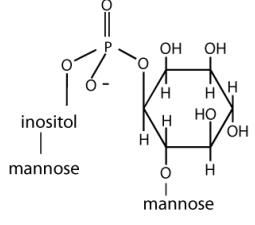
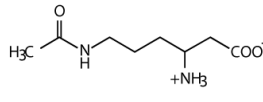
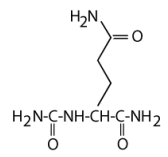
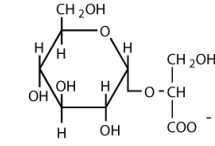
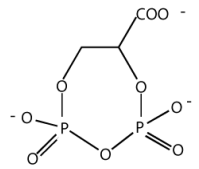
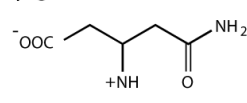
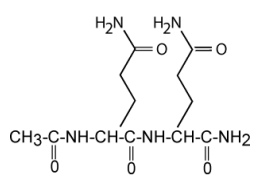
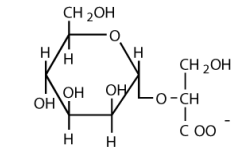
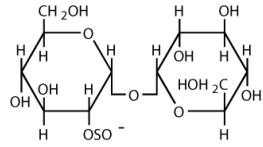
osmolitos con carga neta neutra	osmolitos no cargados	osmolitos aniónicos (conteniendo grupos carboxilato, fosfato y sulfato)	
betaína 	α-glucosilglicerol 	L-α-glutamato 	α-diglicerol fosfato 
ectoína 	α-manosilgliceramido 	β-glutamato 	di-mio-inositol-1,1'-fosfato 
hidroxiectoína 	trehalosa 	hidroxibutirato 	manosil-DIP 
Nγ-acetilaminobutirato 	sacarosa 	poli-β-hidroxibutirato 	inositol mannosil-DIP 
Ne-acetil-β-lisina 	N-α-carbamoil-L-glutamina 1-amida 	α-glucosilglicerato 	2,3-difosfoglicerato cíclico 
β-glutamina 	N-acetilglutaminil glutamina amida 	α-manosilglicerato 	sulfotrehalosa 

Figura I.1. Solutos compatibles clasificados por su estructura química e identificados en organismos procariotas. (Figura adaptada de Roberts , 2005).

Dentro de procariotas, la prolina fue inicialmente identificada en varios halófilos del género *Bacillus* y en la bacteria no halófila *B. subtilis*, donde es sintetizada a partir de glutamato en tres reacciones consecutivas en las que intervienen las enzimas codificadas por los genes *proB*¹, *proA*² y *proC*³ (Sleator y Hill, 2002; Emphadinhas y da Costa, 2008). Posteriormente, se demostró que cepas de *Bacillus* halófilas y

halotolerantes acumulan preferentemente ectoína, sola o en combinación con prolina dependiendo de las concentraciones de NaCl en el medio.

¹ El producto codificado por este gen es una γ -glutamil quinasa

² La proteína que codifica es γ -glutamil fosfato reductasa

³ La proteína que codifica es Δ -1-pirrolina-5-carboxilato reductasa.

Bacterias gram-negativas como *E. coli* y *S. typhimurium* suelen acumular este compuesto por los sistemas de transporte de prolina: PutP, ProP y ProU. Los dos últimos son osmóticamente inducibles y responden significativamente a un choque hiperosmótico, si bien es ProP el que contribuye en mayor medida a la osmoadaptación por la captación de prolina (Csonka *et al.*, 1988).

Por otro lado, la **glicina betaína** (N, N, N-trimetil glicina) se considera un soluto compatible universal que parece extenderse en los tres dominios, desde miembros de eubacterias y arqueas, con diversas características ecofisiológicas, hasta plantas halotolerantes y algas (Emphadinhas y da Costa, 2008). Este soluto tan versátil es captado del medio externo por muchos organismos utilizándolo para adaptarse a condiciones de estrés salino. Por otro lado, la síntesis de este compuesto es un fenómeno extraño en bacterias heterótrofas y muy común en bacterias fotótrofas y arqueas metanogénicas que presentan tolerancia a elevada salinidad. En realidad, el término “biosíntesis” de glicina betaína se utiliza para describir la reacción de oxidación de su precursor; la **colina**, aceptándose esta reacción enzimática como la alternativa a la síntesis “de novo”. La obtención de glicina betaína a partir de colina se ha estudiado en detalle en bacterias como *E. coli*, de modo que la colina es transportada por los sistemas de transporte de alta y baja afinidad BetT y ProU, para posteriormente convertirla en glicina betaína con la participación de las enzimas BetA (colina deshidrogenasa) y BetB (glicina betaína aldehído deshidrogenasa). Los genes que codifican estas proteínas se encuentran agrupados en el operón *bet*IBA, osmóticamente inducible. BetI es una proteína represora sensible a la colina presente en el medio (Sleator y Hill, 2002). Sin embargo, el transporte de osmolitos en los organismos es un proceso energéticamente más favorable que su síntesis, de manera que la acumulación de estos compuestos a partir de fuentes exógenas habitualmente inhibe la síntesis intracelular. *E. coli* y *S. typhimurium* presentan dos permeasas osmorreguladas, ProP y ProU, que median la captación de la mayoría de los osmoprotectores en estas dos bacterias. ProP, además de transportar glicina betaína (en respuesta a un choque osmótico) también capta prolina y ectoína con afinidades

similares. ProU es un sistema de tipo ABC que se induce a nivel transcripcional y presenta mayor afinidad por betaínas que por prolina.

Por último, se ha visto el papel osmoprotector de algunos aminoácidos N-acetilados como son el de la **N^δ-acetil-ornitina** y **N^ε-acetil-β-lisina**. El primero de ellos fue identificado en casi todas las especies de *Bacillus*, mientras que el segundo parece ser exclusivo de arqueas metanogénicas donde es sintetizado en condiciones de estrés salino a partir de los genes *abIA* (lisina-2,3-aminomutasa) y *abIB* (β-lisina acetiltransferasa) (Pflüger *et al.*, 2003; Wohlfarth *et al.*, 1993). Otras formas cíclicas de aminoácidos N-acetilados, la **ectoína** y su derivado **hidroxiectoína** (Figura I.2), fueron identificados como principales solutos compatibles en la bacteria fotótrofa de azufre *Ectothiorhodospira halochloris* y en *Halobacillus halophilus*. La ectoína se sintetiza en *Halobacillus* como soluto mayoritario durante fase estacionaria por acción de las proteínas codificadas por los genes del operón *ectABC*, que es omóticamente inducido por altas concentraciones de NaCl (Galinski *et al.*, 1985; Saum y Müller, 2008).

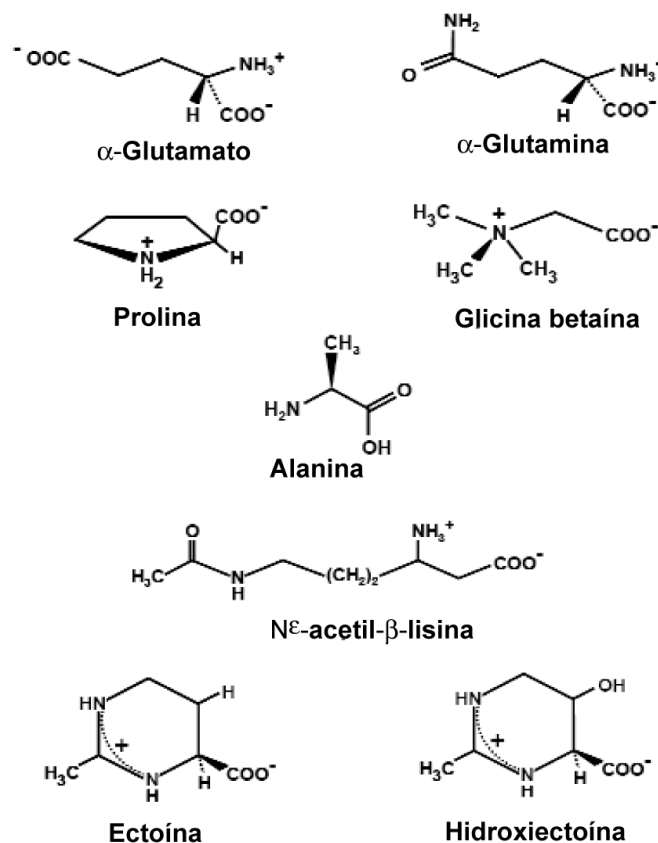


Figura I.2. Estructura de algunos aminoácidos y derivados, acumulados como solutos compatibles en organismos procariotas.

Hasta el momento, las plantas y animales no parecen producir este compuesto y la síntesis intracelular como soluto orgánico únicamente ha sido detectada en bacterias halófilas. La mayoría de las bacterias no halófilas lo captan del medio y lo utilizan como un potente osmoprotector.

3.2. Acumulación de polioles como solutos compatibles.

Polioles como el **glicerol**, **arabitol**, **sorbitol**, **manitol** e **inositol** son solutos compatibles característicos de hongos halotolerantes y de algunas algas y plantas. La utilización de polioles como solutos compatibles en bacterias es un fenómeno muy poco frecuente, aunque se da en algunas como son *Zymomonas mobilis* y *Pseudomonas putida* (Kets *et al.*, 1996; Loos *et al.*, 1994). A diferencia de la mayoría de bacterias heterótrofas, *Z. mobilis* es capaz de convertir sacarosa en glucosa y sorbitol, utilizándolo después como soluto compatible. De forma similar *P. putida* sintetiza y acumula manitol en respuesta a estrés osmótico. Otros microorganismos, como algunas cianobacterias con moderada tolerancia a sal, sintetizan **glucosilglicerol** (figura 1) como osmolito en condiciones de estrés salino (Mikkat *et al.*, 1996). Las proteobacterias halotolerantes *Pseudomonas mendocina* y *Stenotrophomonas rhizophila* también producen este compuesto que es un derivado estructural del galactosilglicerol de algunas algas rojas (Mikkat *et al.*, 2000).

3.3. Acumulación de polioles con enlaces fosfodiéster en bacterias hipertermófilas y termófilas.

El término “termófilo” habitualmente se emplea para definir a organismos con temperaturas óptimas de crecimiento entre 65°C y 80°C, mientras que el término “hipertermófilo” se utiliza para organismos con temperaturas óptimas de crecimiento superiores a 80°C. Entre estos últimos microorganismos, el **di-*mio*-inositol fosfato (DIP)** es el mayor soluto compatible acumulado, principalmente en respuesta a temperaturas de crecimiento por encima de las óptimas (Santos y da Costa, 2002). En el primer organismo donde fue identificado fue en la arquea *Pyrococcus woesei* y posteriormente se ha visto que es acumulado por muchas otras hipertermófilas de los géneros *Aeropyrum*, *Aquifex*, *Archaeoglobus*, *Pyrodictium*, *Pyrobulus*, *Stetteria*, *Thermococcus* y *Thermotoga* (Santos *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 1992). También se ha descubierto la acumulación de este compuesto en las bacterias termófilas *Rubrobacter xylanophilus* y *Phersephonella marina* (Empadinhas *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2007).

La ruta biosintética del DIP así como los genes implicados fueron estudiados y caracterizados por Rodionov y colaboradores (2007) y Rodrigues y colaboradores (2007).

Otros compuestos portadores de enlaces fosfodiéster (Figura I.3.) que han sido identificados como solutos compatibles en organismos hipertermófilos, son el **di-manosil-di-*mio*-inositol fosfato (DMDIP)**, cuya concentración aumenta en respuesta a estrés térmico en bacterias del género *Thermotoga*, el **diglicerol fosfato (DGP)** que se acumula en *Archaeoglobus* en condiciones de estrés salino y el **gliceril-*mio*-inositol fosfato (GIP)**, una quimera estructural de DIP y GIP que es acumulado por *Aquifex pyrophilus* y *Archaeoglobus fulgidus* con una doble función, osmoprotectora y termoprotectora, en respuesta a una combinación de ambos estreses térmico y salino (Lamosa *et al.*, 2000; Lamosa *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 1996).

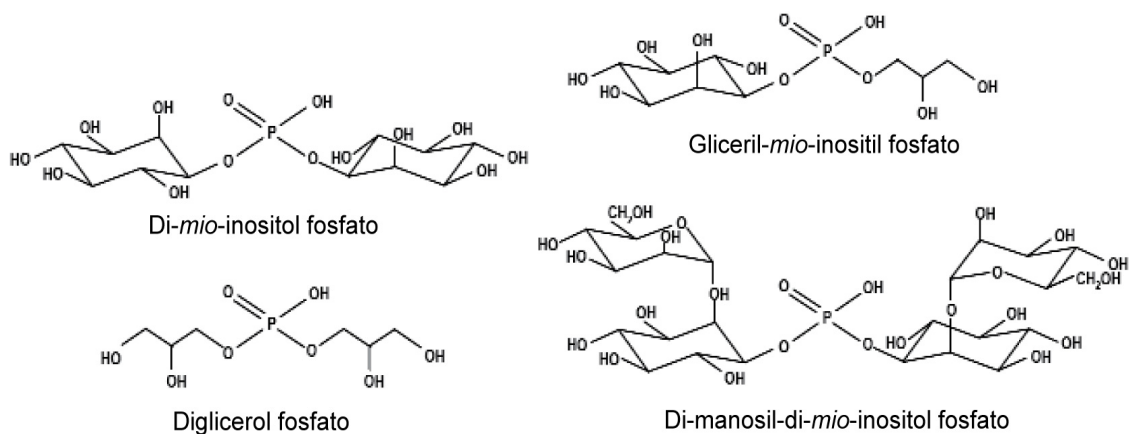


Figura I.3. Estructura de los principales polioles con enlaces fosfodiéster acumulados como solutos compatibles en organismos hipertermófilos y termófilos.

3.4. Acumulación de Manosilglicerato y Manosilglicerámido.

El **manosilglicerato (MG)** fue identificado como soluto orgánico en el alga roja *Polysiphonia fastigiata* aunque las concentraciones en este organismo no están correlacionadas con un aumento de la salinidad del medio. Sin embargo, se ha detectado este compuesto en bacterias termófilas como *Thermus thermophilus* y *Rhodothermus marinus* donde la acumulación de este soluto compatible sí tiene lugar en respuesta a estrés salino. Algunas cepas de *T. thermophilus*, una bacteria halotolerante moderada, se han clasificado en función de su tolerancia a NaCl. El MG y la trehalosa son los compuestos mayoritarios acumulados dependiendo de las

distintas concentraciones de NaCl que pueden llegar a tolerar, sugiriendo que el MG únicamente es requerido para la adaptación en concentraciones de baja de salinidad. Una situación similar ocurre con *Rhodothermus marinus*, donde el MG se acumula con el aumento de la salinidad del medio. Sin embargo, cuando se alcanzan las máximas concentraciones de sal en la que puede crecer, aparece una forma neutra como principal soluto compatible. Este compuesto se denomina **Manosilglicerámido** (MGA) y podría sintetizarse a partir de la amidación del MG, aunque los genes y la correspondiente enzima no han sido identificados todavía (Nunes *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 1999).

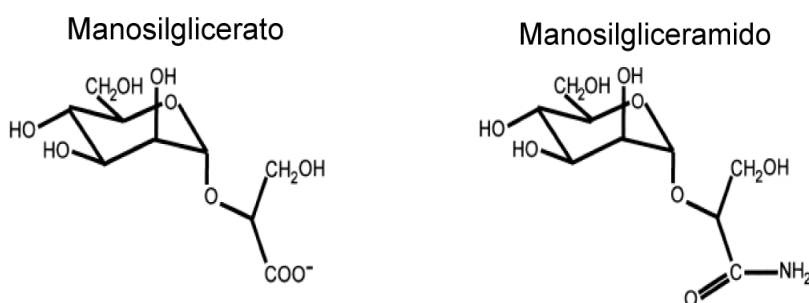


Figura I.4. Estructura de los solutos compatibles manosilglicerato y manosilglicerámido.

3.5. Acumulación de Glucosilglicerato, Glucosil-glucosilglicerato y Manosil-glucosilglicerato.

El **Glucosilglicerato (GG)** es un análogo estructural del MG (**Figura I.5**) y fue identificado en primer lugar en la cianobacteria marina *Agmellum quadruplicatum* en condiciones limitantes de nitrógeno. Posteriormente, se ha detectado como soluto compatible en la γ -proteobacteria *Erwinia chysanthermi* en condiciones limitantes de nitrógeno y estrés salino, remplazando a los solutos glutamina y glutamato, que se sintetizan cuando las concentraciones de nitrógeno son abundantes en el medio (Goude *et al.*, 2004). En un primer lugar, este compuesto fue asociado a organismos mesófilos pero también ha sido identificado en algunas bacterias termófilas, sugiriendo finalmente que el GG y MG estarían desempeñando un papel funcionalmente intercambiable en la adaptación a estrés (Empadinhas y da Costa, 2008).

Otros compuestos derivados de GG son el **glucosil-(1,6)-glucosilglicerato (GGG)** y el **manosil-(1,2)-glucosilglicerato (MGG)**. Aunque el primero de ellos

(GGG), ha sido detectado en *Pherosephonella marina*, inicialmente fue identificado en pequeñas cantidades en micobacterias como un intermediario de la síntesis de un lipopolisacárido con metilglucosa muy poco frecuente (Kamisango *et al.*, 1987). Por otro lado, el MGG se descubrió en *Petrotoga miotherma* donde se acumula con un aumento de la concentración de NaCl en el medio. En concentraciones superiores de NaCl este soluto es reemplazado por prolina y α -glutamato (Jorge *et al.*, 2007).

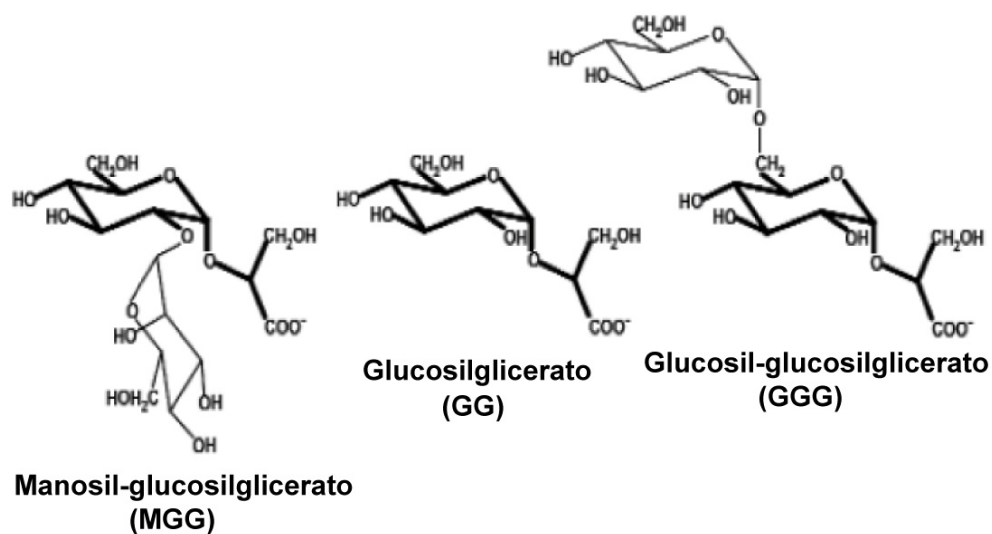


Figura 1.5. Estructura del glucosilglicerato (GG) y sus derivados manosil-glucosilglicerato (MGG) y glucosil-glucosilglicerato (GGG).

3.6. Acumulación de Bifosfoglicerato cíclico en arqueas metanogénicas.

El **2,3-bifosfoglicerato cíclico (cBPG)** (Figura I.1) es uno de los solutos compatibles que acumulan algunas arqueas metanogénicas para neutralizar las cargas positivas derivadas de la acumulación de K^+ . Este compuesto se ha detectado en arqueas con un rango amplio de temperaturas de crecimiento. No parece tener un papel osmoprotector, pero sí múltiples funciones: además de ser un eficiente termoprotector, también actúa como un intermediario en la ruta gluconeogénica y como reservorio de fosfato para la síntesis de ATP (Gorkovenko y Roberts, 1993; Shima *et al.*, 1998).

3.7. Trehalosa y sacarosa como azúcares osmoprotectores.

3.7.1. Acumulación de sacarosa.

La **sacarosa** es un disacárido no reductor formado por glucosa y fructosa que se acumula principalmente en plantas (Lunn y MacRae, 2003). Entre los organismos procariotas, únicamente cianobacterias de aguas dulces y marinas y algunas proteobacterias lo acumulan como soluto compatible en condiciones de estrés osmótico. Se sabe que bacterias como *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* aprovechan la sacarosa en condiciones de estrés, utilizando el disacárido como un potente osmoprotector no acumulado y como fuente de carbono y energía simultáneamente. Esta forma de emplear sacarosa como osmoprotector no acumulado estaría contribuyendo de modo indirecto a la acumulación de solutos compatibles de síntesis endógena (Gouffi *et al.*, 1999).

Las rutas para la síntesis de sacarosa fueron caracterizadas en primer lugar en plantas superiores y después en algas verdes y cianobacterias (Lunn, 2002). La primera consiste en la formación de sacarosa mediante dos reacciones enzimáticas en las que intervienen la SPS (sacarosa-6-fosfato sintasa) y la SPP (sacarosa-6-fosfato fosfatasa) a través de un intermediario fosforilado similar a la ruta TPS/TPP de trehalosa. Los genes *sps* y *spp* pueden estar localizados en regiones separadas del cromosoma pero también pueden formar un mismo operón e incluso estar fusionados en un gen bifuncional. Otra ruta alternativa identificada en plantas superiores y en algunas cianobacterias filamentosas del género *Anabaena*, implica una sacarosa sintasa (SuS) que cataliza la condensación enzimática de ADP-glucosa y fructosa para formar sacarosa (Curatti *et al.*, 2000). La reacción catalítica de la enzima SuS es reversible y parece que su actividad está implicada mayoritariamente en el catabolismo de la sacarosa.

3.7.2. Acumulación de trehalosa.

A. Biosíntesis de trehalosa.

La **trehalosa** (1-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que se encuentra en diversos organismos, desde bacterias, arqueas, levaduras y hongos hasta plantas e invertebrados. Se trata de un soluto capaz de proteger numerosas estructuras biológicas (proteínas y membranas celulares) frente a

varios tipos de estrés, incluyendo desecación, oxidación, calor, frío, deshidratación, congelación y condiciones hiperosmóticas (Simola *et al.*, 2000; Singer y Lindquist, 1998). Se ha observado que la trehalosa es un soluto osmorregulado acumulado por muchos organismos en respuesta a distintos tipos de estrés, mediante síntesis “de novo” como soluto predominante en ausencia de solutos compatibles exógenos. Muchas son las funciones que se le han atribuido a este disacárido. En bacterias, además de ser un conocido osmoprotector, la trehalosa puede ser utilizada como fuente de carbono y energía y como parte de la estructura de la pared celular. En bacterias de los géneros *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*, la trehalosa es un componente de glicolípidos de la pared celular. En levaduras además de ser un eficiente osmoprotector, la trehalosa 6-fosfato actúa como un regulador del flujo metabólico de glucosa durante la glucólisis. En insectos es el azúcar más abundante de la hemolinfa y en los músculos del tórax donde es consumida durante el vuelo. Hasta hace unos años, se pensaba que la trehalosa únicamente se sintetizaba en plantas como las llamadas “resurrección” como *Selaginella lepidophylla* y *Myrothammus flabellifolius*, donde el disacárido era la molécula clave para protegerlas del estrés por sequía. Sin embargo, numerosos estudios realizados con plantas transgénicas, así como la disponibilidad de información de secuencias genómicas de algunas plantas, han mostrado que la trehalosa es sintetizada en muchas otras plantas. En *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, se ha demostrado que la trehalosa desempeña un papel fundamental en el desarrollo embrionario y en la señalización del ácido abscísico y azúcares. Además, se conoce también el papel de la trehalosa como fuente de carbono y energía y como molécula señal en rutas metabólicas específicas (revisado por Elbein *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2006 y Paul *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, se han descrito cinco rutas para la biosíntesis de este disacárido; la ruta TPS/TPP, TreS, TreY/TreZ, TreP y por último la ruta TreT (Figura I.6). La ruta **TPS/TPP** fue la primera que se descubrió hace 50 años y también la más ampliamente distribuida. Presente en todos los procariotas y organismos eucariotas que sintetizan trehalosa, es la única ruta presente en plantas, y consiste en dos reacciones enzimáticas llevadas a cabo por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) que forma trehalosa-6-fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, y por la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) que utiliza la trehalosa-6-fosfato para formar trehalosa libre liberando fosfato inorgánico. Los genes que codifican estas dos enzimas se identificaron originalmente en *E. coli* y se denominan *otsA* y *otsB*. La segunda ruta de síntesis de trehalosa es llevada a cabo por una trehalosa sintasa (**TreS ó TS**) donde existe una isomerización reversible del enlace α 1,4 de una maltosa

a α 1,1, dando lugar a una molécula de trehalosa (De Smet *et al.*, 2000). Es exclusiva de bacterias y fue descubierta en primer lugar en *Pimelobacter*. Después, ortólogos de este gen (*treS*) han sido identificados en otras bacterias. La ruta **TreY/TreZ** ha sido detectada en arqueas termófilas del género *Sulfolobus* y las bacterias del género *Arthrobacter* y *Rhizobium* entre otras. En esta ruta la trehalosa se sintetiza a partir de maltodextrinas (maltooligosacáridos, glucógeno y almidón), de modo que la maltooligosil trehalosa sintasa (MOTS), codificada por el gen *treY*, transglicosila el último enlace del extremo reductor de la cadena de una conformación α 1,4 a α 1,1, para formar maltooligosil trehalosa. Después, una maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (MOTTH), codificada por el gen *treZ*, cataliza la liberación de la trehalosa terminal. La cuarta ruta, la trehalosa fosforilasa (**TreP**), presente en hongos (*Agaricus bisporus*) y algunos protistas (*Euglena gracilis*), cataliza la hidrólisis reversible de trehalosa en presencia de fosfato inorgánico. La transferencia de una molécula de glucosa a un fosfato genera glucosa-1-fosfato y libera otro residuo de glucosa. Esta reacción es reversible “in vitro”, pero “in vivo” parece transcurrir preferentemente hacia la degradación del disacárido, por lo que la participación de TreP en la síntesis no está clara (Wannet *et al.*, 1998a). La última ruta biosintética ha sido descubierta recientemente en las arqueas extremófilas *Thermococcus litoralis* y *Pyrococcus* y en la bacteria *Thermotoga maritima*, en las que una trehalosa glucosiltransferasa (**TreT**) cataliza la formación reversible de trehalosa a partir de ADP-glucosa y glucosa, aunque también puede emplear UDP-glucosa o GDP-glucosa con menor eficiencia (Qu *et al.*, 2004).

La mayoría de microorganismos poseen una única ruta biosintética, pero algunos de ellos, incluyendo *M. tuberculosis*, *C. glutamicum*, *T. thermophilus*, *Rubrobacter xylanophilus*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhodobacter sphaeroides* pueden poseer varias de ellas (Avonce *et al.*, 2006; Dominguez-Ferreras *et al.*, 2009; Empadinhas y da Costa, 2008; Makihara *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2003; Streeter y Gómez, 2006). Se piensa que la presencia de varias rutas en un organismo asegura la acumulación de trehalosa en diferentes condiciones ambientales. En cambio, resulta muy curioso que ninguna de las cinco rutas biosintéticas hayan sido localizadas en vertebrados, aunque sí se ha encontrado la enzima que degrada este disacárido, la trehalasa.

En la figura I.6 se muestra un esquema de las cinco rutas de síntesis de trehalosa caracterizadas, mientras que en la figura I.7 se esquematiza su distribución en organismos eucariotas y procariotas.

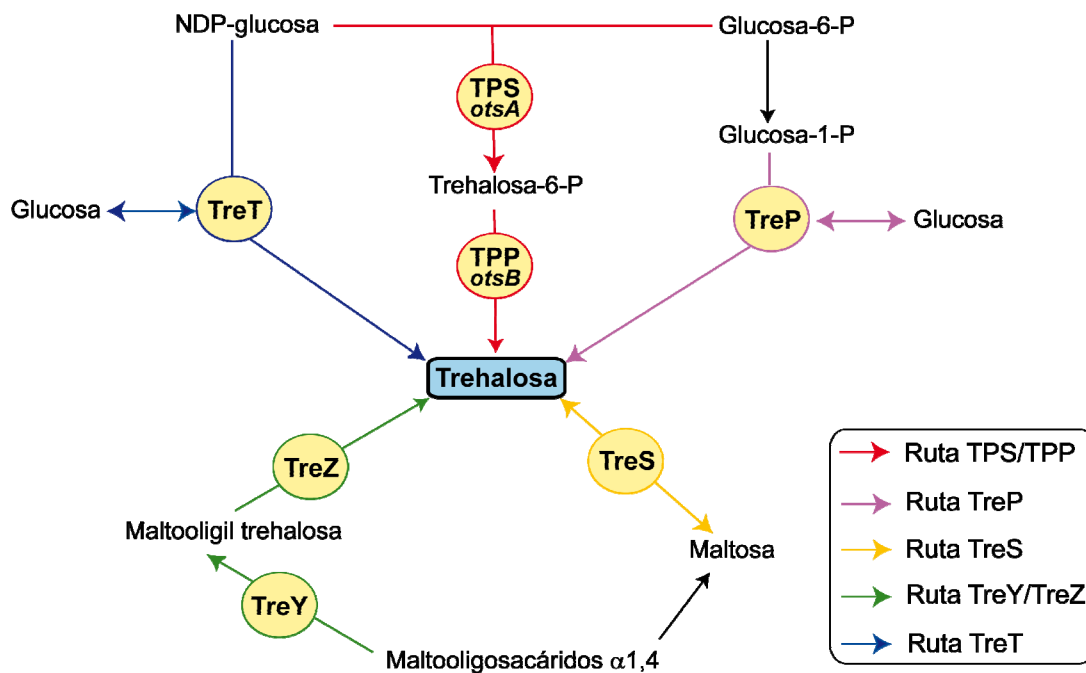


Figura I.6. Representación de las cinco rutas biosintéticas de trehalosa. **TPS**; trehalosa-6-fosfato sintasa, **PPP**; trehalosa-6-fosfato fosfatasa, **TreS**; trehalosa sintasa, **TreY**; maltoligil-trehalosa sintasa, **TreZ**; maltoligil-trehalosa trehalohidrolasa, **TreP**; trehalosa fosforilasa, **TreT**; trehalosa glicosiltransferasa. Figura modificada de Empadinhas y da Costa., 2008.

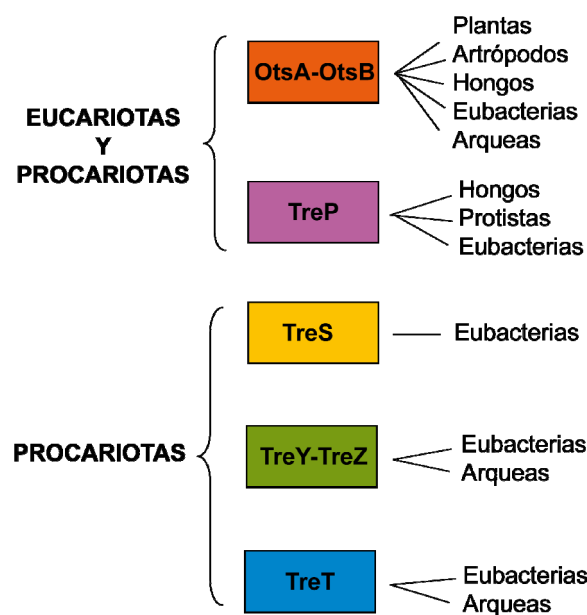


Figura I.7. Distribución de las enzimas de las rutas de síntesis de trehalosa conocidas en organismos eucariotas y procariotas. Figura modificada de Empadinhas y da Costa., 2008.

B. Transporte y utilización de trehalosa.

La trehalosa además de ser un eficiente osmoprotector, es utilizada por numerosos organismos como fuente de carbono y energía. Mientras la biosíntesis sigue aproximadamente un mismo patrón entre los distintos organismos (mediante las rutas OtsAB, TreYZ y TreS), existen diferentes sistemas enzimáticos para la degradación de este disacárido (Figura I.8). Se han descrito al menos tres enzimas para el catabolismo, aunque en la mayoría de los organismos la degradación de trehalosa procede por la vía trehalasa, una ruta bastante caracterizada en *E. coli* y *B. subtilis* en la que la trehalosa es hidrolizada formando dos moléculas de glucosa (Boos *et al.*, 1987; Elbein *et al.*, 2003; Horlacher *et al.*, 1996). Esta enzima también ha sido identificada en otros muchos microorganismos, hongos, plantas y animales (Elbein, 1974). Por otro lado, la trehalosa también puede ser transportada a través de la membrana tanto por una permeasa como por un sistema fosfotransferasa (PTS), llegando al citoplasma de la célula en forma de trehalosa sin modificar o como trehalosa 6-fosfato (T6P) (Andersson *et al.*, 2001).

Por último, además de la trehalasa, se han identificado otras enzimas que degradan trehalosa. Entre ellas estarían una trehalosa fosforilasa, una trehalosa-6-fosfato fosforilasa y finalmente una trehalosa-6-fosfato hidrolasa (Figura I.8) (Andersson *et al.*, 2001; Belocopitow y Marechal, 1970; Rimmele y Boos, 1994).

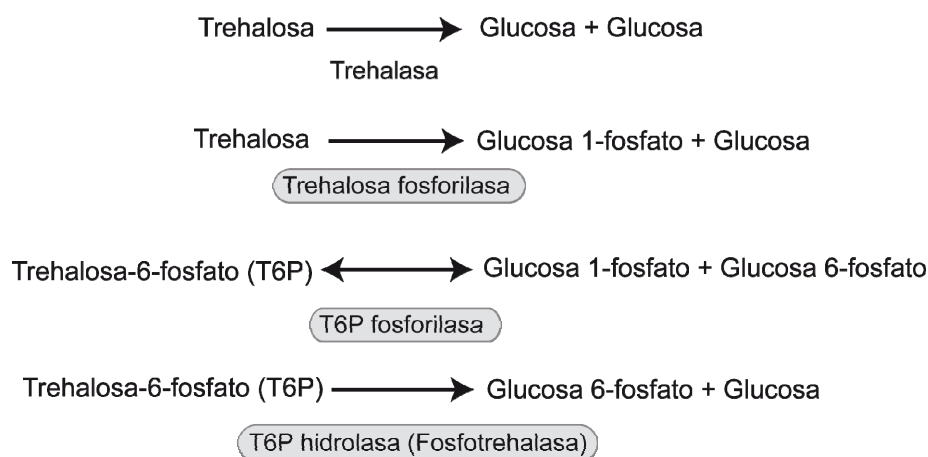


Figura I.8. Principales rutas de degradación de trehalosa caracterizadas en distintos organismos.

B.1. Transporte y utilización de trehalosa en *E. coli*.

E. coli sintetiza trehalosa como osmoprotector en condiciones de elevada osmolaridad por la acción de las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa codificadas por los genes *otsA* y *otsB*. Estos genes se encuentran en el cromosoma de esta bacteria formando un operón que se induce en condiciones hiperosmóticas y al comienzo de la fase estacionaria. Esta inducción depende del factor de transcripción alternativo RpoS, que actúa durante la fase estacionaria de crecimiento de tal modo que la trehalosa por sí misma no está implicada en la regulación de este operón (Giaever *et al.*, 1988; Hengge-Aronis *et al.*, 1991). Sin embargo, *E. coli* tiene la capacidad de utilizar trehalosa como fuente de carbono tanto en condiciones de baja como de elevada osmolaridad. El problema de la degradación y de la síntesis simultánea en condiciones hiperosmóticas está resuelto mediante el empleo de dos rutas metabólicas para la trehalosa bien separadas y compartimentadas, de forma que las enzimas biosintéticas se localizan en el citoplasma y la enzima que rompe la trehalosa, codificada por el gen *treA*, actúa en el periplasma (Boos *et al.*, 1987). **TreA (Figura 1.9)** es una trehalasa que degrada el disacárido en dos moléculas de glucosa. Posteriormente, la glucosa es transportada por un sistema fosfotransferasa específico de tipo II al citoplasma (Boos *et al.*, 1990). Esta trehalasa periplásmica, de forma similar al operón *otsAB*, se induce en condiciones de estrés salino y no por trehalosa. Así, mutantes en el gen *treA* de *E. coli* no pueden crecer en trehalosa como única fuente de carbono en condiciones hiperosmóticas, en cambio sí pueden hacerlo en condiciones de baja osmolaridad. Este suceso se debe a la existencia de una ruta alternativa para la degradación de trehalosa que únicamente se expresa en condiciones de baja osmolaridad. En estas condiciones, un sistema compuesto por una fosfotransferasa de tipo II específica de trehalosa (EIICB^{tre}, codificado por el gen ***treB***) (Klein *et al.*, 1995) junto con otro PTS específico de glucosa (EIIA^{Glc}) transportan el disacárido en forma de trehalosa 6-fosfato al interior del citoplasma donde es hidrolizado después por una hidrolasa citoplásmica (trehalosa 6-fosfato hidrolasa), el producto del gen ***treC***, dando glucosa y glucosa 6-fosfato (Rimmele y Boos, 1994). Los genes *treB* y *treC* forman un operón cuya expresión es inducida por trehalosa 6-fosfato y regulada mediante represión por catabolito de la glucosa.

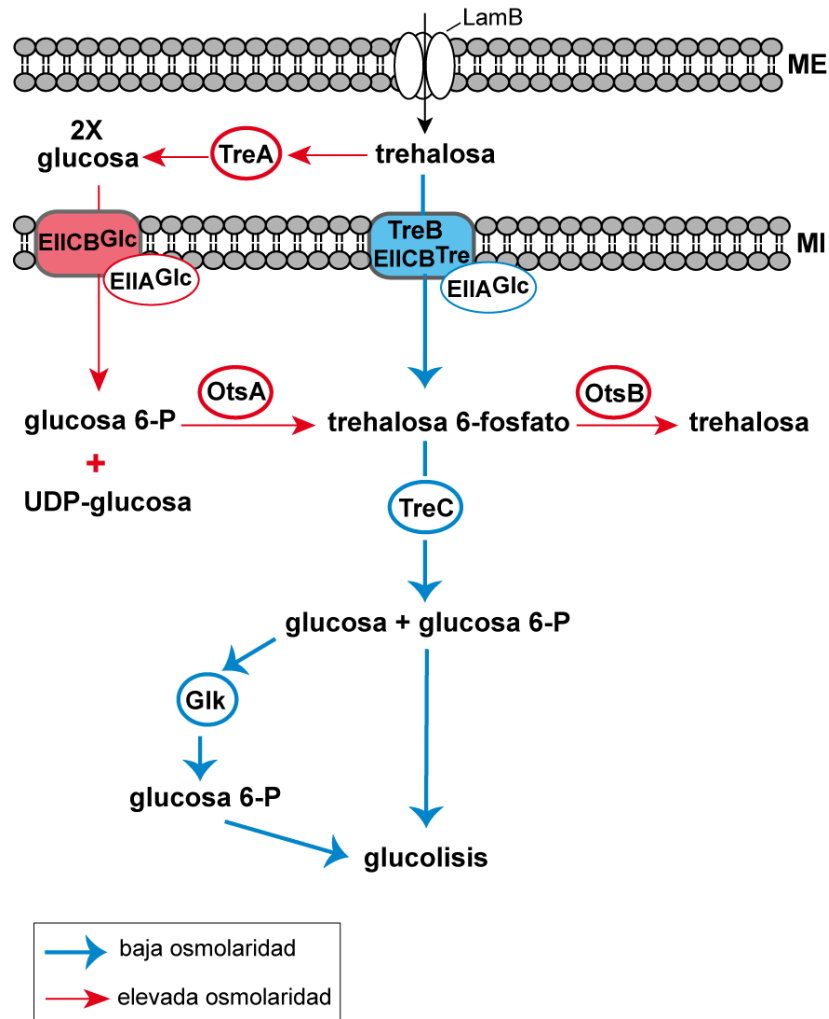


Figura 1.9. Modelo de transporte y utilización de trehalosa en *E. coli*. La trehalosa es introducida al interior del periplasma mediante el poro LamB. En condiciones de baja osmolaridad (ruta metabólica de color azul), la trehalosa es transportada al interior de la célula por **TreB** en forma de trehalosa 6-fosfato (T6P) donde es hidrolizada por **TreC** a glucosa y glucosa 6-fosfato. La glucosa libre es fosforilada por una glucoquinasa (**Gik**) de modo que la glucosa 6-fosfato entra después en la glucólisis. En condiciones de elevada osmolaridad (ruta de color rojo), *treB* y *treC* se encuentran reprimidos y la trehalosa es hidrolizada en el periplasma por la enzima **TreA**. La glucosa formada es transportada al interior celular en forma de glucosa 6-fosfato a través de un sistema fosfotransferasa específico (EII^{Glc}-EIIA^{Glc}). Por otro lado, la trehalosa es sintetizada en estas condiciones hiperosmóticas mediante la ruta **OtsAB** utilizando UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato como sustratos.

B.1.1. Regulación del metabolismo de trehalosa en *E. coli*.

La regulación de la ruta metabólica de utilización de trehalosa en condiciones de baja y elevada osmolaridad está controlada principalmente por TreR (Horlacher y Boos, 1997). Esta proteína (codificada por el gen *treR*) es un represor que controla la expresión del operón *treBC*. Se trata de un dímero que puede unirse tanto a trehalosa 6-fosfato (K_d de 10 μM) como a trehalosa (K_d de 280 μM), de tal modo que la trehalosa 6-fosfato es la molécula inductora de TreR. La unión de trehalosa a TreR no afecta a la afinidad del represor para unirse al operador del operón *treBC* mientras que la trehalosa 6-fosfato reduce su afinidad permitiendo por tanto la transcripción de los genes *treB* y *treC*. Así, TreR regula la transcripción de los genes de la trehalosa dependiendo de las concentraciones relativas de trehalosa 6-fosfato y trehalosa que haya en la célula (Hars *et al.*, 1998). Por último, el gen *treR* se localiza aguas arriba del promotor del gen *treB*. Esta región génica formada por los genes *treBC* y *treR* se encuentra bastante conservada en algunas bacterias como *P. fluorescens* y *B. subtilis* (Matthijs *et al.*, 2000; Gotsche y Dahl, 1995).

B.1.2. Caracterización de una nueva trehalasa citoplásmica en *E. coli*.

En 1996 Horlacher y colaboradores caracterizaron una nueva enzima citoplásmica que hidroliza trehalosa en dos moléculas de glucosa. La nueva trehalasa, a la que denominaron **TreF** (codificada por el gen *treF*), presenta elevada homología y propiedades bioquímicas similares con la trehalasa periplásmica TreA. La regulación de TreF depende parcialmente del factor sigma de fase estacionaria RpoS y su síntesis está débilmente inducida por condiciones de elevada osmolaridad pero no por la presencia de trehalosa en el medio. La posible función que pudiera tener TreF, según estos autores, podría ser la de eliminar y utilizar la trehalosa endógena después de que las células hayan regresado a su estado normal tras un periodo de estrés hiperosmótico.

Se muestran en la tabla I.1 las propiedades bioquímicas de las trehalasas TreA y TreF.

Tabla I.1. Propiedades bioquímicas de TreA y TreF de *E. coli*.

	Tamaño y Masa Molecular	K_m	V_{max} (μmol trehalosa hidrolizada/min/mg de proteína)	pH óptimo
TreA	565 aa, 58 kDa	0,8 mM	66 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	5,5
TreF	549 aa, 64 kDa	1,9 mM	54 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	6,0

Ambas enzimas son monómeros con dominios glicosil hidrolasa y comparten un 47% de identidad en su secuencia aminoacídica. No obstante, TreA contiene 30 residuos en su extremo C-terminal que no están presentes en TreF y TreF posee en su extremo N-terminal 60 aminoácidos que no están en TreA (Horlacher *et al.*, 1996).

B.2. Utilización de trehalosa en otros organismos.

B.2.1. Degradación de trehalosa en hongos.

Las células de hongos pueden llegar a acumular trehalosa hasta alcanzar aproximadamente un 30% del peso seco, por lo que es importante destacar las numerosas funciones y la relevancia que tiene el disacárido en estos organismos, en los que actúa como un estabilizador de proteínas y membranas celulares, y como un regulador del metabolismo (en levaduras), pudiendo afectar a enzimas clave como la hexoquinasa (Elbein *et al.*, 2003). Sin embargo, son muchas las cuestiones que están aún sin responder acerca de las rutas de degradación de este disacárido. Existen dos sistemas enzimáticos diferentes encargados de degradar la trehalosa. El primero consiste en una fosforilación reversible dando lugar a glucosa y glucosa 1-fosfato mediante la enzima trehalosa fosforilasa. Esta ruta ha sido identificada en un número limitado de hongos entre los que se incluyen *Pichia fermentas* (Schick *et al.*, 1995), *Grifola fondosa*, *Schizophillum commune*, *Fammulina velutipes* (Eis *et al.*, 1998; Eis y Nidetzky, 1999; Kitamoto *et al.*, 1988) y *Agaricus bisporus* (Wannet *et al.*, 1998b). El segundo sistema enzimático está presente en la mayoría de los hongos y consiste en la hidrólisis irreversible de trehalosa en dos moléculas de glucosa mediante dos tipos de trehalasas. Estas enzimas reciben el nombre de trehalasa **neutra** o citoplásmica y trehalasa **ácida** o extracelular, denominadas así por su localización y su pH óptimo (Parrou *et al.*, 2005). La información existente sobre la trehalasa neutra (pH óptimo cerca de 7) es bastante amplia y abundante, de tal modo que el gen que la codifica ha sido clonado y expresado de varias especies de hongos como *Aspergillus*, *Neurospora* (d'Enfert *et al.*, 1999), *S. cerevisiae* (Kopp *et al.*, 1993), *Schizosaccharomyces* (Soto *et al.*, 1998), *Kluyveromyces* (Amaral *et al.*, 1997), *Candida albicans* (Coutinho *et al.*,

2003) y en el patógeno de plantas *Magnaporthe grisea* (Foster *et al.*, 2003). El principal papel de esta proteína podría ser la regulación de los niveles de trehalosa endógena. Se sabe que se activa por la unión de calcio y la fosforilación a partir de una quinasa dependiente de AMP cíclico. *S. cerevisiae* posee dos genes (NTH1 y NTH2) que codifican dos isoformas con un 77% de identidad. La copia NTH2 se expresa en niveles bajos durante la fase exponencial de crecimiento y en presencia de glucosa, mientras que su expresión aumenta en fase estacionaria después de haberse consumido la glucosa (Nwaka *et al.*, 1995). Por otro lado, el gen que codifica para la trehalasa ácida ha sido aislado en las levaduras *S. cerevisiae* (Destruelle *et al.*, 1995) y *C. albicans* (Pedreño *et al.*, 2004) y en el hongo filamentoso *A. nidulans* (d'Enfert y Fontaine, 1997). Esta enzima parece tener un tipo de regulación postraduccional y una actividad a un pH óptimo de 4,5-5. Aunque esta proteína fue detectada en la vacuola, es secretada a la envoltura celular mediante un mecanismo no identificado. Un mutante en el gen que codifica para esta enzima extracelular no puede crecer en trehalosa como única fuente de carbono, lo que sugiere que su principal función es la asimilación de trehalosa exógena (Nwaka *et al.*, 1995; Nwaka *et al.*, 1995). Parrou y colaboradores (2005) plantearon un modelo para la asimilación de trehalosa en *S. cerevisiae* similar al de *E. coli*, apuntando a la ruta de hidrólisis dependiente de trehalasa ácida extracelular como el principal sistema. Sin embargo, estos autores incluyen en este modelo una ruta adicional de asimilación de trehalosa, constituida por el transportador Agt1p y la enzima NTH, que desempeñaría un importante papel durante la fase temprana del crecimiento (**Figura I.10.**).

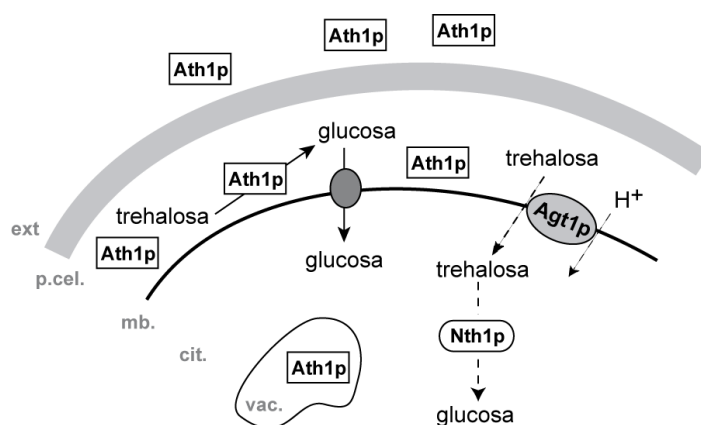


Figura I.10. Modelo de asimilación de trehalosa en *S. cerevisiae*. La principal ruta asimilatoria de trehalosa depende de la trehalasa ácida del espacio periplásmico (**Ath1p**). Asimismo, existe una ruta alternativa que transporta el disacárido al citosol donde será finalmente hidrolizado por la trehalasa neutra (**Nth1p**) (Modificado de Parrou *et al.*, 2005).

B.2.2. Trehalosa y trehalasa en plantas.

Los primeros descubrimientos de trehalosa en plantas estuvieron restringidos a plantas de resurrección como las especies de *Shelaginella* y *Myrothamnus flabellifolia*. La ausencia de este disacárido en la mayoría de las plantas superiores hizo suponer que la trehalosa tenía una mínima relevancia y que su función estaba extinguida y había sido remplazada por la sacarosa. Esta opinión cambió aproximadamente hace 10 años mediante el diseño de plantas transgénicas en las que se les introdujo la ruta biosintética de trehalosa (TPS-TPP) codificada por los genes de *E. coli* y levaduras (Goddijn *et al.*, 1997). Poco después, los genes funcionales de las enzimas TPS y TPP fueron identificados en *Arabidopsis thaliana* (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998) y la posterior secuenciación del genoma de esta planta puso de manifiesto la sorprendente existencia de genes para la síntesis de este compuesto. La trehalosa 6-fosfato podría considerarse un potente azúcar señal que posiblemente esté coordinando el metabolismo con el desarrollo en respuesta a la disponibilidad de carbono y estrés (Paul *et al.*, 2008). Este azúcar es muy poco común en plantas vasculares pero ha sido detectado en plantas que desarrollan enfermedades (Keen y Williams, 1969) o colonizadas por microorganismos, también en raíces micorrizadas (Schubert *et al.*, 1992), nódulos fijadores de nitrógeno (Streeter *et al.*, 1985) y nódulos de actinorrizas (López y Torrey, 1985). Sin embargo, las cantidades de trehalosa acumuladas son en general muy pequeñas y limitadas. Se pensaba que los niveles tan bajos en plantas posiblemente eran debidos a la presencia de la única enzima responsable de degradar trehalosa en glucosa en plantas: la trehalasa (Müller *et al.*, 2001). La inhibición de la actividad trehalasa utilizando validamicina A como un potente inhibidor de la enzima, produjo una acumulación de trehalosa en plantas como *Glicine max* (Müller *et al.*, 1995) y *Lotus japonicus* (Streeter y Gómez *et al.*, 2006), apuntando a esta enzima como la principal responsable para el control del contenido de trehalosa en nódulos de leguminosas. A pesar de ello, por el momento no se ha establecido una clara correlación entre el contenido de trehalosa y la actividad trehalasa en nódulos de raíces de leguminosas. Algunos autores consideran que la trehalasa del nódulo podría estar regulada de una forma mucho más compleja que por la mera inducción del sustrato (Müller *et al.*, 1994). Se han determinado trehalasas en muy pocas especies de plantas, y el gen que codifica la enzima ha sido caracterizado en *G. max* (Aeschbacher *et al.*, 1999), *Arabidopsis* (Müller *et al.*, 1992), *Oryza sativa* (Buell *et al.*, 2003) y *Phaseolus vulgaris*. En soja, la trehalasa es una glicoproteína apoplástica y el gen que la codifica aparece expresado en forma de una sola copia en

niveles muy bajos en raíces, nódulos, hojas y flores. Aunque la actividad trehalasa es diez veces superior en nódulos que en raíces, la expresión del gen en nódulos no fue detectada a nivel de ARN sugiriendo una regulación de tipo postranscripcional de la enzima (Müller *et al.*, 1992; Aeschbacher *et al.*, 1999). Estos datos contrastan con los recientes resultados obtenidos por López y colaboradores (2008) en *Medicago truncatula*. La expresión del gen que codifica la trehalasa (*MTTRE1*) se induce en nódulos con respecto a hojas y raíces. En cambio, su actividad estaría reprimida en condiciones de estrés salino, permitiendo la acumulación de trehalosa. Estos resultados indicarían una regulación de la enzima de tipo transcripcional en nódulos de leguminosas en presencia del microsimbionte.

Finalmente, aunque existe alguna información acerca de trehalosa y trehalasa en plantas, poco se sabe sobre su papel y significado fisiológico en leguminosas, así como su posible implicación en la respuesta a estrés salino. No obstante, la reducción de la actividad trehalasa en nódulos de *M. truncatula* y la consiguiente acumulación de trehalosa, sugiere que este disacárido pueda actuar en concentraciones bajas como un estabilizador de proteínas y membranas en condiciones de estrés salino (López *et al.*, 2008).

II-REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS EN PROCARIOTAS.

1. FACTORES SIGMA ALTERNATIVOS.

Los factores sigma principales tales como σ^{70} en *E. coli* y σ^{43} en *B. subtilis* (Gardella *et al.*, 1989), promueven la transcripción de genes esenciales para la célula en crecimiento exponencial. En la mayoría de las especies bacterianas se han identificado factores sigma alternativos que controlan la transcripción de genes relacionados con diversos procesos celulares, cuyas secuencias promotoras son muy diferentes a aquellas reconocidas por los factores sigma principales.

En *E. coli*, el factor sigma alternativo S (σ^S o RpoS) está relacionado con la resistencia a diferentes tipos de estreses; falta de nutrientes, estrés osmótico, estrés oxidativo, cambios de temperatura y entrada en fase estacionaria. Por ejemplo, los genes *otsAB*, *treA* (*osmA*), *osmB*, *proU* y *proP* que están implicados en la osmoadaptación de bacterias, se encuentran regulados por sigma S (Hengge-Aronis, 1996). Este factor de transcripción alternativo se considera el regulador maestro de respuesta a estrés general en esta bacteria, y su actividad está controlada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Hengge-Aronis, 2002).

Una segunda clase de factores sigma alternativos está representada por el factor sigma E o σ^E (codificado por el gen *rpoE*), que pertenece a la subfamilia ECF (“extracytoplasmic function”) y se caracteriza por regular la expresión de un conjunto de genes que responden a estímulos extracitoplásmicos (Helmann, 2002). La actividad de σ^E está controlada negativamente por un factor anti-sigma transmembrana y en *E. coli* dirige su propia transcripción en un operón constituido por los genes *rpoE*, *rseA*, *rseB* y *rseC*. Además de estos genes, también regula al gen *htrA* (serín proteasa periplásmica o DegP) necesario para la resistencia a altas temperaturas, al gen *fkpA* implicado en el plegamiento de proteínas y al factor sigma H (σ^H o σ^{32}) de choque térmico. Su inducción tiene lugar principalmente por alteraciones de proteínas de la membrana externa (como OmpC y OmpF) y altas temperaturas.

En *E. coli* el factor de transcripción σ^{32} (RpoH) se considera un componente principal en la regulación de la respuesta a estrés por choque térmico, teniendo un papel muy importante en la transcripción de un conjunto de genes que codifican proteasas, chaperonas moleculares citoplásmicas y otros factores de plegamiento (Gross *et al.*, 1996). Todas estas proteínas que son reguladas por sigma H reciben el nombre de proteínas de choque térmico o proteínas Hsp (“Heat shock proteins”) y entre ellas destacan las chaperonas DnaKDnaJ-GrpE, GroEL-GroES y IbpA/B y las proteasas HflB (FtsH), HslUV (ClpYQ) y ClpAP/ClpXP.

Por otro lado, la respuesta a estrés por choque térmico tiene lugar cuando las células están sometidas a elevadas temperaturas provocando una desestabilización y desnaturalización de proteínas celulares. σ^H y σ^E son dos factores sigma alternativos que dirigen la expresión de un gran número de genes para reparar aquellos polipéptidos y proteínas degradadas sintetizando las llamadas proteínas de choque térmico (Hsps). Estos reguladores actúan dependiendo de la localización celular en la que haya tenido lugar el daño proteico, de manera que σ^H dirige la síntesis de chaperonas y factores de plegamiento regulando la respuesta a estrés en el citoplasma (Yura y Nakahigashi, 1999), mientras que σ^E controla un conjunto de genes que sintetizan proteínas en respuesta al daño producido en la envoltura celular (membrana externa, membrana interna y periplasma) (Alba y Gross, 2004). Este tipo de regulación forma parte de la ruta de respuesta a estrés extracitoplásmico.

2. SISTEMAS DE RESPUESTA A ESTRÉS EXTRACITOPLÁSMICO EN *E. coli*.

La envoltura celular bacteriana es un compartimento complejo, dinámico y crucial para la integridad y la supervivencia de la célula. No forma una estructura

estática sino que cambia en respuesta a las distintas condiciones medioambientales y, para sobrevivir a estos cambios, la información debe transmitirse desde la envoltura hasta el citoplasma. Los componentes esenciales que conducen la información son rutas transmembrana de transmisión que detectan y dirigen la señal hasta los factores de transcripción del citoplasma. Estas moléculas activan la transcripción de un conjunto de genes generando las respuestas que restauran la integridad de la envoltura, la función y la adaptación a las necesidades celulares y distintas condiciones medioambientales.

En la bacteria *E. coli* se han identificado tres rutas/sistemas de transducción de la señal en respuesta a estrés extracitoplásmico. Estos sistemas actúan frente a varios estreses permitiendo el mantenimiento y la protección de la envoltura celular bacteriana. Las dos primeras rutas de transmisión de la señal son aquellas formadas por los sistemas de transducción de señales de dos componentes CpxAR (Raivio y Silhavy, 1999) y BaeSR (Raffa y Raivio, 2002). La tercera ruta está controlada por el factor alternativo de función extracitoplásmica σ^E (Ades, 2004; Raivio y Silhavy, 1999; Alba y Gross, 2004). Inicialmente, el papel de estas rutas estaba asociado al mantenimiento y biogénesis de la envoltura, pero estudios recientes han relacionado la adaptación a estrés extracitoplásmico (CpxAR, BaeSR y σ^E) con la patogénesis de algunas bacterias gram-negativas (Raivio, 2005).

2.1. Sistemas de transducción de señales de dos componentes.

La ruta de transducción de la señal mediada por **CpxAR** está formada por un sistema de dos componentes donde *cpxA* codifica una histidín-quinasa de membrana (CpxA) y *cpxR* codifica un regulador de respuesta citoplasmático (CpxR). CpxA es la molécula sensora que se autofosforila y se activa al recibir la señal. La señal inductora son las proteínas desnaturalizadas y mal plegadas como consecuencia del estrés extracitoplásmico. A continuación, esta quinasa transfiere el fosfato a la proteína reguladora CpxR que una vez fosforilada funciona como un factor de transcripción, induciendo un conjunto de genes entre los cuales destacan aquellos que codifican la proteasa periplásmica DegP/HtrA, la disulfuro oxidasa DsbA, el regulador negativo CpxP y genes que codifican factores de virulencia. Estos genes están implicados en el ensamblaje del “pilus” bacteriano (Raivio, 2005); (**Figura I.11**). Este mecanismo de transmisión de la señal responde a una serie de estreses que afectan a la envoltura de la célula, entre ellos destacan el estrés por pH alcalino, la sobreexpresión de la

lipoproteína NlpE, desnaturalización de los componentes del pilus y otras alteraciones en los componentes de la membrana.

El segundo mecanismo de respuesta a estrés está regulado por otro sistema de dos componentes, **BaeSR**. Este sistema, a pesar de no estar implicado directamente en patogénesis, se piensa que podría tener un papel muy importante en la supervivencia bacteriana e infección de algunas células hospedadoras (Raffa y Raivio *et al.*, 2002). Esta ruta reguladora se activa en respuesta a compuestos antimicrobianos como el indol, la novobiocina, sales biliares y antibióticos beta-lactámicos e implica la activación de los genes *mdtABC* y *acrD*, los cuales codifican componentes de bombas de detoxificación (Hirakawa *et al.*, 2003; Nagakubo *et al.*, 2002; Baranova y Nikaido, 2002).

2.2. Respuesta a estrés extracitoplásmico. Factor de transcripción σ^E .

La respuesta llevada a cabo por el factor σ^E (codificado por *rpoE*) se activa principalmente por las alteraciones en la biosíntesis de proteínas de membrana externa y porinas (OMP). En *E. coli*, tanto σ^E como la función fisiológica que desempeña en el mantenimiento de las proteínas de la envoltura en condiciones adversas, es esencial (De Las *et al.*, 1997). La transducción de la señal consiste en una cascada proteolítica mediada por el factor anti-sigma de membrana RseA. Ésta comienza a partir de su degradación por la proteasa periplásmica DegS en respuesta a los precursores de membrana desnaturalizados o mal plegados (Ades *et al.*, 1999; Alba y Gross, 2004).

2.2.1. Regulación del factor alternativo σ^E en *E. coli*.

En *E. coli*, la ruta de transmisión de la señal que activa a σ^E en respuesta a la desnaturalización y desintegración de las porinas (OMP) de la membrana externa, así como su regulación, es uno de los procesos más estudiados.

La actividad de σ^E está negativamente regulada por el factor anti-sigma de membrana RseA (Ades *et al.*, 1999). RseA se encuentra unido a σ^E por el dominio citoplásmico y lo mantiene en su forma inactiva, evitando su interacción con la ARN polimerasa (Figura I.12a.). Las perturbaciones en la membrana y la posterior acumulación de las porinas en el periplasma como consecuencia del estrés, provocan la degradación de RseA por la acción secuencial de dos proteasas integrales de membrana; la proteína DegS y RseP. Esta cascada proteolítica permite la liberación

en el citoplasma del factor σ^E en su forma activa y una vez libre se une a la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un conjunto de genes que forman el regulón σ^E (Figuras I.12b y I.12c). Junto con estas proteínas, existe una proteína periplásmica, RseB, que regula negativamente a σ^E uniéndose al dominio periplásmico de RseA y protegiéndola de la proteólisis (Ades *et al.*, 1999; De Las *et al.*, 1997).

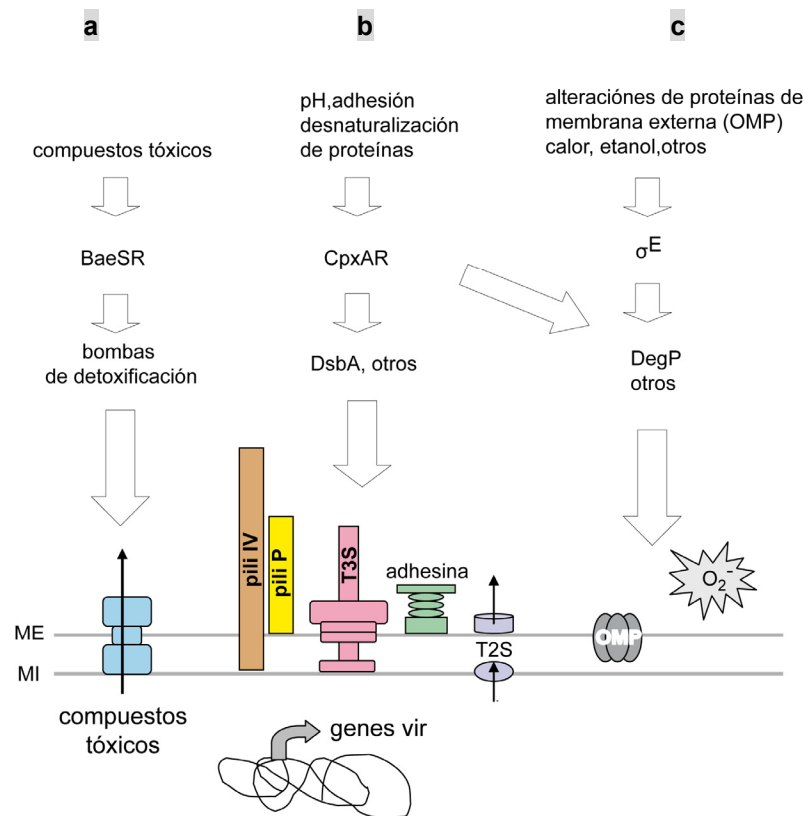


Figura I.11. Representación esquemática de los sistemas de respuesta a estrés extracitoplásmico. **a;** Sistema Bae, que controla el aumento de la resistencia a compuestos tóxicos (incluyendo antibióticos) mediante la inducción de al menos dos bombas de detoxificación independientes. **b;** Sistema Cpx que induce la expresión de un conjunto de genes, entre ellos *dsbA* y genes que codifican proteasas de la envoltura como la proteína DegP. La inducción de Cpx también tiene efectos en el ensamblaje del pilus IV y P, así como la regulación de genes de virulencia en algunas especies de patógenos. DsbA afecta también al pilus, a sistemas de secreción tipo III (T3S) y II (TS2) y adhesinas. **c;** Factor σ^E alternativo de respuesta a estrés extracitoplásmico que regula la expresión de DegP (entre otros) y responde a proteínas de membrana externa o porinas (OMP), estrés oxidativo, calor, etanol y otros estreses (Raivio, 2005).

Introducción

Estos genes regulados por σ^E codifican una gran variedad de proteínas con funciones de respuesta a estrés, entre ellas, el factor sigma de choque térmico σ^H , así como proteínas implicadas en la síntesis, plegamiento o degradación de proteínas de membrana externa. Además, se piensa que σ^E puede estar regulado también al comienzo de la fase estacionaria mediante mecanismos todavía sin caracterizar (Costanzo y Ades, 2006).

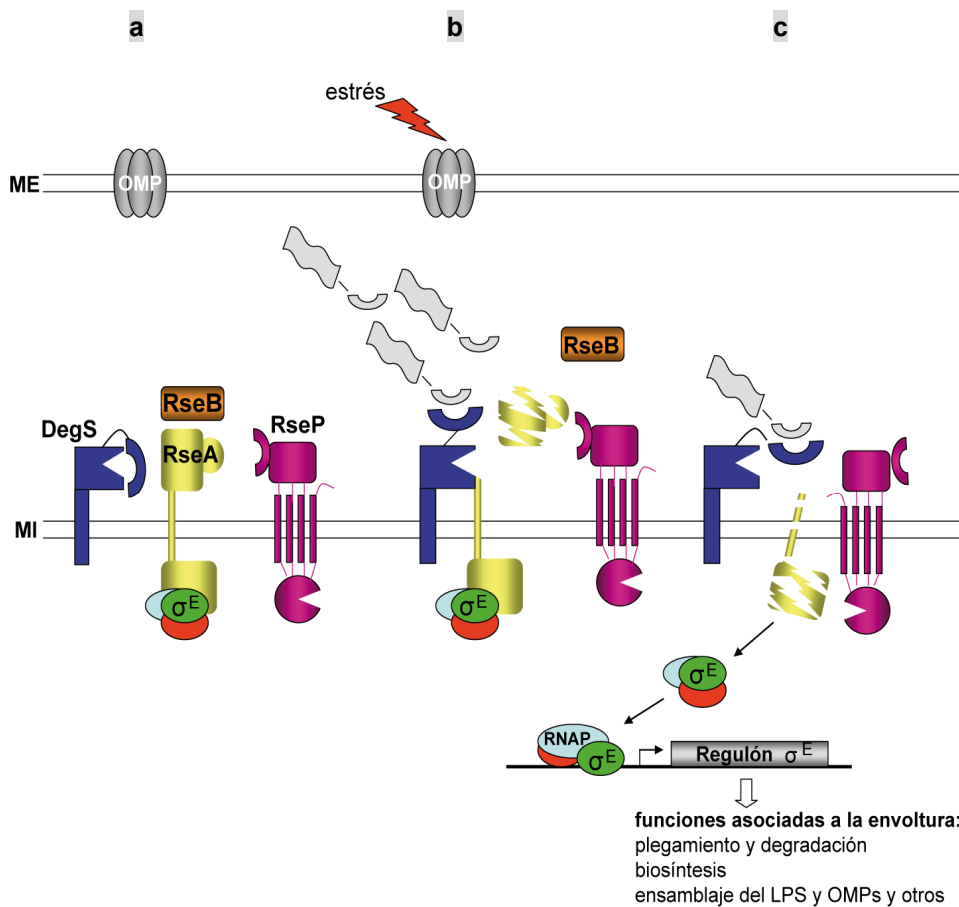


Figura I.12. Respuesta a estrés extracitoplásmico mediada por el factor alternativo σ^E en *E. coli*. **a**; en condiciones normales σ^E se encuentra secuestrado en la membrana por la proteína RseA (en amarillo). RseB (en naranja) está unida a RseA por el dominio periplásmico y la protege de la proteólisis. **b**; la desnaturalización proteica (OMP's y otros) en la membrana externa como consecuencia del estrés inicia la degradación de RseA por la proteína DegS (en azul). **c**; La proteína RseA parcialmente degradada actúa como sustrato de RseP (en morado). Su unión a RseA permite la liberación de σ^E de su dominio citoplásmico. Una vez libre en el citoplasma σ^E se une a la ARN polimerasa (RNAP) para activar la transcripción de un conjunto de genes del regulón σ^E (figura modificada de Hayden y Ades, 2008).

III. SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSAS.

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre y sin embargo es un elemento nutritivo escaso para muchos organismos. El N₂ atmosférico no es utilizable por la mayoría de los seres vivos, que únicamente lo incorporan en formas combinadas, como nitrato o amonio. La fijación biológica del N₂ (FBN), proceso que está restringido a organismos procariotas, aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres.

Las Leguminosas o Fabáceas constituyen la segunda familia de plantas con mayor importancia agronómica y alimentaria para la humanidad, por detrás de las Gramíneas. Además, presentan un gran atractivo desde el punto de vista ecológico por su capacidad para fijar nitrógeno en asociación con bacterias conocidas genéricamente como rizobios. Dichas bacterias constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos en 13 géneros: *Sinorhizobium (Ensifer)*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Shinella*, *Burkholderia* y *Cupriavidus*. Durante la simbiosis, estas bacterias inducen la formación de un nuevo órgano en la raíz de la planta denominado nódulo, dentro del cual ocurre la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. La nitrogenasa es la enzima clave en la fijación de nitrógeno y requiere un alto consumo energético, por ello su síntesis y actividad están sujetas a una estricta regulación en presencia de nitrógeno combinado y oxígeno. Gracias a este proceso la planta obtiene una fuente de nitrógeno directamente asimilable, por lo que su nutrición nitrogenada se hace independiente del nitrógeno presente en el suelo.

El proceso de nodulación es complejo y consiste en una serie de etapas en las que se necesita la expresión coordinada de genes de la planta y de la bacteria, que se consigue mediante el intercambio mutuo de señales químicas. Esta comunicación molecular que se establece entre los simbioses es altamente específica, constituyendo uno de los elementos que determinan la conocida especificidad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El diálogo molecular comienza con el reconocimiento por la bacteria de una serie de compuestos contenidos en los exudados de semilla y raíz, principalmente flavonoides, ácidos aldónicos y betaínas (Figura I.13). Estas moléculas, que varían en cantidad y composición dependiendo de la especie vegetal y las condiciones de crecimiento, son capaces de activar los denominados genes de nodulación bacterianos. La activación de estos genes incluye a la actuación de un grupo de factores de transcripción de la familia LysR, que son conocidos como **NodDs**. La activación de los genes de nodulación conlleva la síntesis

de un conjunto de enzimas encargadas de la producción y exportación de los denominados **factores Nod** o **de nodulación**. Se trata de moléculas de tipo lipoquitooligosacárido, compuestas por un esqueleto básico de residuos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) unidos por enlaces β -1,4, con una serie de modificaciones dependiendo de la estirpe bacteriana (D'Haeseleer y Holsters, 2002). Cada especie bacteriana produce varios tipos de factores Nod, que son específicamente reconocidos por los hospedadores compatibles de dicha bacteria. Así, la producción de los factores Nod por la bacteria resulta ser el mayor determinante de especificidad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, definiendo el rango de hospedadores susceptibles de ser infectados por una cierta estirpe o especie de rizobio (Perret *et al.*, 2000).

La percepción de los factores de nodulación por parte del pelo radical va a provocar una serie de cambios en la raíz, principalmente en las células de la epidermis y del córtex, como la despolarización de la membrana y la deformación y curvatura de los pelos radicales y el inicio de la organogénesis nodular. La elevada sensibilidad y especificidad con la que los factores de nodulación inducen estas respuestas hizo suponer la existencia de una cascada de señalización mediada por uno o múltiples receptores (Cullimore *et al.*, 2001). Por ejemplo, la ausencia del gen *MtNFP* en *Medicago truncatula*, un miembro de la familia de receptores LysM, hace que no pueda producirse la curvatura del pelo radical en la planta y no pueda responder a una serie de cambios transcripcionales en respuesta al factor Nod (Amor *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006). Entre los genes receptores de factores Nod esenciales más conocidos de *Lotus japonicus* destacan el gen *LjNFR5* (cuyo ortólogo sería el *MtNFP* de *M. truncatula*) y el gen *LjNFR1*. La implicación de estos genes en la percepción de la señal así como su importancia en la activación de la respuesta fisiológica y celular de la planta (en las primeras etapas de la simbiosis) ha sido también demostrada (Oldroyd y Downie, 2004; Radutoiu *et al.*, 2003).

Después de que los rizobios se hayan unido a los pelos radicales, se induce en estos un cambio en la dirección de su crecimiento apical, produciéndose así la curvatura del pelo radical (Figura I.13). A continuación, las bacterias penetran a través de la pared celular del pelo quedando atrapadas en una estructura tubular denominada "cordón de infección", que contiene una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal, la cual sigue creciendo y progresando hasta la base del pelo radical. El crecimiento del cordón de infección es dirigido a las células del córtex, que de forma simultánea se dividen y proliferan activamente originando el primordio nodular. El cordón de infección se ramifica al alcanzar las células del primordio nodular, y los rizobios son posteriormente liberados al citoplasma de las células vegetales. Mediante

un proceso similar a la endocitosis, las bacterias quedan englobadas en estructuras a modo de orgánulos denominadas “simbiosomas” (Figura I.13), donde los rizobios se diferencian en formas especializadas en la fijación de dinitrógeno atmosférico llamadas bacteroides. Este proceso de diferenciación implica cambios morfológicos, fisiológicos y metabólicos respecto a las bacterias en vida libre. La membrana peribacteroidal (MPB), de origen vegetal, constituye una interfase física entre los simbiosomas. Se considera que los bacteroides dependen de la planta hospedadora para todos los nutrientes excepto el nitrógeno, por lo que el flujo C/N entre los simbiosomas se establece a través de la MPB. El carbono reducido que se suministra al bacteroide, necesario para la producción de la energía que la nitrogenada necesita, es predominantemente a través de ácidos dicarboxílicos (revisado por Gage, 2004 y Jones *et al.*, 2007).

Por otra parte, los rizobios producen una gran variedad de polisacáridos de superficie. Los tipos principales son los glucanos cíclicos, lipopolisacáridos (LPS), los exopolisacáridos (EPS) y los polisacáridos capsulares (KPS), comunes a todos los rizobios, a excepción de un grupo específico de KPS ácidos que únicamente han sido descritos en el género *Sinorhizobium*. Se sabe que estas moléculas participan en el proceso simbiótico, particularmente durante el proceso de infección, protegiendo al rizobio de la reacción defensiva de la planta ante la invasión microbiana, aunque se desconocen los mecanismos concretos mediante los que se produce este bloqueo. Además, los glucanos cíclicos, localizados en el periplasma bacteriano, intervienen en osmoadaptación, los LPS son constituyentes de la membrana externa y los EPS participan en la adhesión a sustratos, en la estructura de las colonias y presumiblemente en la defensa frente a agresiones externas (Leigh y Walker, 1994; Becker y Pühler, 1998; Fraysse *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2008).

Dependiendo de la leguminosa, existen dos tipos de nódulos, indeterminados y determinados. La principal diferencia entre ambos radica en el tejido central del nódulo. Los nódulos determinados son de forma esférica y se originan a partir de la división de un meristemo con actividad transitoria formado a partir de células del córtex externo; en estos nódulos, todas las células del interior se dividen, proliferan y entran en senescencia simultáneamente. Mientras que los nódulos tipo indeterminado, se originan a partir de divisiones de células de córtex interno y adquieren una forma cilíndrica por la presencia de un meristemo persistente. Debido a que el tamaño del meristemo es constante, la actividad de división celular y la producción de nuevas

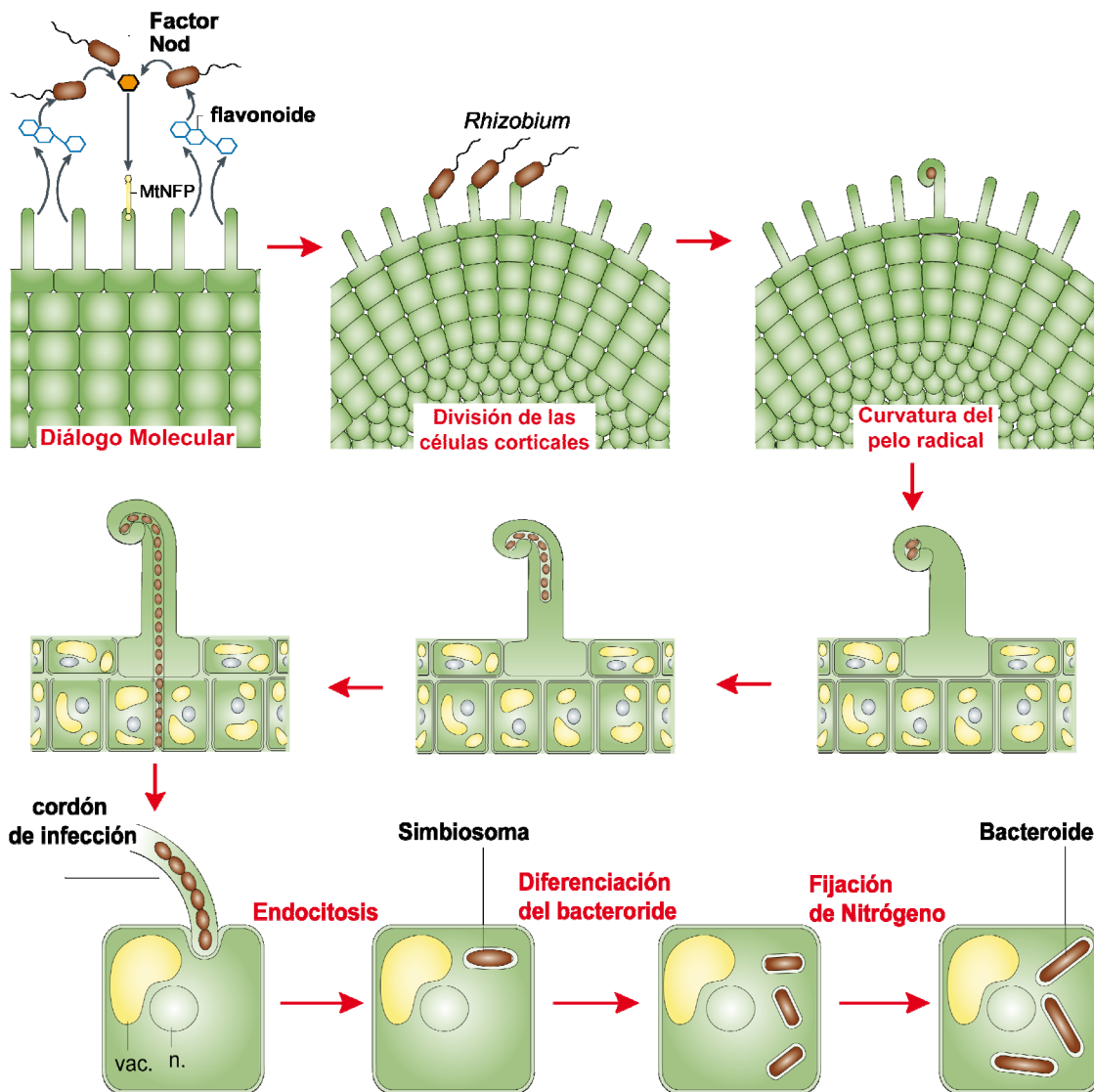


Figura I.13. Representación esquemática del proceso de nodulación. Primera fase que comienza con el intercambio de señales entre ambos simbios. Los flavonoides de la planta inducen en la bacteria la producción de factores Nod, los cuales a su vez provocan una serie de respuestas por parte de la planta susceptible de ser infectada por el rizobio, entre ellas la división de las células corticales y curvatura del pelo radical que envuelve a la bacteria. Formación del cordón de infección y crecimiento del mismo hasta la base del pelo radical y las células del córtex. Liberación de las bacterias al citosol vegetal. Endocitosis y formación del simbiosoma. Por último, diferenciación del bacterioide fijador del dinitrógeno atmosférico (adaptado de Jones *et al.*, 2007).

células meristemáticas se encuentra equilibrada con la salida del mismo número de células del ciclo mitótico. Este proceso provoca un gradiente de etapas de desarrollo en el nódulo, desde el meristemo en el extremo apical hasta el tejido senescente en la

base del mismo (Mergaert *et al.*, 2006). Las leguminosas que forman nódulos determinados son generalmente de origen tropical, como las especies *Glicine max*, *Vicia faba* y *Lotus japonicus*. Por otro lado, *Medicago sativa*, *Medicago truncatula*, *Pisum sativum*, especies de *Vicia* y *Trifolium* son leguminosas que forman nódulos de tipo indeterminado.

1. OSMOADAPTACIÓN EN *RHIZOBIUM*.

1.1. Osmoprotectores y solutos compatibles en rizobios.

La acumulación de potasio intracelular es una de las respuestas más comunes de los rizobios durante la adaptación a estrés osmótico. Algunos autores observaron un aumento en la síntesis de glutamato durante la exposición a estrés salino, un compuesto que es además utilizado como fuente de carbono y nitrógeno cuando las condiciones de osmolaridad se restablecen (Botsford, 1984; Botsford y Lewis, 1990; Zahran, 1999). También es conocida la importancia del sistema Kup de *Rhizobium tropici* para el crecimiento en medios de alta osmolaridad y su implicación en la fijación de nitrógeno en nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Nogales *et al.*, 2002).

Estudios recientes en nuestro laboratorio han determinado la importancia de cada uno de los sistemas de transporte de K^+ en las bacterias *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 (Domínguez-Ferreras, 2007). La presencia de genes homólogos al sistema Trk de bacterias es poco frecuente entre los rizobios. Componentes de este sistema sólo aparecen codificados en los genomas de *S. meliloti* 1021, en *S. medicae* WSM419 y en *Mesorhizobium* sp. BCN1. A diferencia de Trk, el sistema Kdp parece estar presente en la mayoría de los genomas secuenciados de la familia *Rhizobiaceae*. Por otro lado, todos los rizobios presentan transportadores Kup, y muchos de ellos como *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 parecen tener dos copias del gen *kup*. En *S. meliloti* el sistema Trk es el principal responsable de la captación de potasio en respuesta a estrés hiperosmótico, especialmente a bajo pH. Mientras que el sistema Kdp, al igual que lo descrito en otras bacterias, únicamente responde en presencia de bajas concentraciones de K^+ y en un medio adicionado de NaCl. Lo mismo ocurre con el sistema Kdp de *M. loti*, donde un mutante en el mismo transportador presenta problemas de crecimiento en condiciones semejantes. Es en esta bacteria donde el transporte de potasio en condiciones de laboratorio parece estar mediado mayoritariamente por los sistemas Kup, ya que carece de sistema Trk (Domínguez-Ferreras 2007, Tesis doctoral). Por último, todos los mutantes obtenidos

en los sistemas de transporte de potasio fueron capaces de nodular y fijar nitrógeno aunque la ausencia de los transportadores Trk y Kup1 en *S. meliloti* produjo un retraso en la nodulación (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009a).

Las respuestas osmoadaptativas de los rizobios no son tan conocidas como en las bacterias modelo *E. coli* y *B. subtilis*. Los rizobios que están expuestos a ambientes hiperosmóticos son capaces de mantener el equilibrio osmótico a través de la membrana por la exclusión de sales y la acumulación de compuestos osmoprotectores o solutos compatibles. En *S. meliloti*, la osmoprotección por el suministro exógeno de compuestos orgánicos difiere en gran medida de la mayoría de las bacterias estudiadas. Esta bacteria puede emplear ectoína, colina, glicina betaína, pipercolato, dimetilsulfoniopropionato (DMSP), sacarosa y trehalosa además de otros disacáridos osmoprotectores que después de ser transportados son catabolizados (salvo el DMSP) incluso en condiciones hiperosmóticas (Talibart *et al.*, 1994; Gouffi *et al.*, 1998, 1999 y 2000). La acumulación de solutos puede ser duradera, como en el caso del DMSP, o transitoria, como la glicina betaína que puede acumularse tras un choque hiperosmótico y después ser metabolizada, siendo sustituida por solutos compatibles de síntesis endógena como el glutamato, el N-acetilglutaminil glutamina amida (NAGGN) y la trehalosa (Miller y Wood, 1996; Smith y Smith, 1989). Además, estos compuestos orgánicos se clasifican en dos grupos: *osmoprotectores no acumulados*, que fueron descritos en esta bacteria por Gouffi y colaboradores (1999, 2000) y *osmoprotectores acumulados* o *solutos compatibles* (incluyendo a sus precursores), que son los que se han observado y estudiado en la mayoría de bacterias. La sacarosa y ectoína son ejemplos de osmoprotectores no acumulados de tal forma que *S. meliloti* los utiliza simultáneamente como fuente de carbono y energía.

La **ectoína** es uno de los osmoprotectores que mejora el crecimiento de *S. meliloti* de forma casi tan efectiva como la glicina betaína. Este compuesto no se acumula en las células sino que es degradado a cualquier osmolaridad y se piensa que estimula la capacidad de adaptación de la célula aumentando los niveles citoplásmicos de otros osmolitos sintetizados endógenamente por un mecanismo que se desconoce (Talibart *et al.*, 1994). En *S. meliloti* se ha identificado una ruta implicada en el transporte y catabolismo de ectoína que se induce por ectoína e hidroxiectoína. Los genes de esta ruta se localizan formando un mismo operón (*ehuABCD-eutABCD*), de forma que los componentes del transportador Ehu de tipo ABC de alta afinidad son responsables del 95% del transporte de ectoína y aunque es inducido por sus sustratos (ectoína e hidroxiectoína), la captación de esta molécula no aumenta en condiciones de elevada salinidad (Jebbar *et al.*, 2005).

Los rizobios acumulan una gran variedad de solutos compatibles endógenos cuya composición varía dependiendo de la especie. Sin embargo, las **betaínas** son solutos compatibles esenciales para la gran mayoría de la familia *Rhizobiaceae*. En *S. meliloti*, la acumulación de glicina betaína por transporte o síntesis a partir de colina o colina-O-sulfato es un fenómeno que está bastante caracterizado. La capacidad de sintetizar este compuesto se debe al operón *bet/CBA*. Sus proteínas se localizan también en *E. coli*, pero a diferencia de esta bacteria *S. meliloti* presenta una colina sulfatasa (BetC) que permite la síntesis de glicina betaína a partir de colina-O-sulfato (Osteras *et al.*, 1998; Mandon *et al.*, 2003). Aunque estos genes se inducen fuertemente en presencia de colina no responden a estrés osmótico o bajas presiones de oxígeno. Por otro lado, la presencia de glicina betaína y prolina betaína en el medio tiene un efecto osmoprotector y *S. meliloti* puede acumular estos compuestos mediante la actividad de tres transportadores identificados; el sistema Hut (Boncompagni *et al.*, 2000), el sistema BetS (Boscari *et al.*, 2002) y el sistema Prb recientemente identificado (Alloing *et al.*, 2006). De las tres actividades, el sistema de alta afinidad BetS es considerado el principal transportador de glicina betaína/prolina betaína en *S. meliloti*, y es requerido para la adaptación inmediata a un choque osmótico. Boscari y colaboradores (2006) observaron que una mutación en el gen *betS* reduce el transporte de prolina betaína en bacteroides pero no posee efecto significativo alguno sobre la nodulación y la fijación de nitrógeno. Tampoco lo hace en plantas sometidas a estrés salino. No obstante, la sobreexpresión del gen *betS* mejora el contenido de betaínas en nódulos de plantas estresadas, favoreciendo el mantenimiento de la fijación de nitrógeno durante las fases iniciales de la adaptación de la planta a estrés osmótico.

En *S. meliloti* la **colina** es un precursor directo de glicina betaína y también de fosfatidilcolina. Este último es el mayor componente lipídico de membrana en la familia *Rhizobiaceae*. Para cubrir las necesidades de colina, *S. meliloti* la importa del medio externo mediante tres actividades de transporte cinéticamente distintas; la primera es constitutiva y de baja afinidad y las otras dos son de alta afinidad, aunque una inducible por colina y la otra constitutiva (Pocard *et al.*, 1989). A pesar de la identificación de estos transportadores, únicamente ha sido caracterizado el sistema Cho altamente específico de colina, que se une a este compuesto con gran especificidad (Dupont *et al.*, 2004). Se trata de un transportador de tipo ABC formado por los genes *choXWV* que se inducen en presencia de colina pero no responden a estrés osmótico. Cho se expresa en bacteroides de nódulos fijadores de *M. sativa* pero un mutante no parece tener efectos sobre el crecimiento de la bacteria ni fenotipo

simbiótico alguno. Estos resultados pueden deberse a la actividad de las otras rutas de transporte que no han sido caracterizadas todavía.

La **trehalosa** es un disacárido muy común en nódulos de raíces de leguminosas y está presente en altas concentraciones en bacteriodes fijadores de nitrógeno. Forma un carbohidrato predominante en especies de *Bradyrhizobium* pero también se ha detectado en cultivos de otras especies rizobianas como *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Streeter, 1985). También se ha observado que la trehalosa es un buen osmoprotector cuando es suministrado exógenamente, aunque en este caso el mecanismo no implica la acumulación, sino que contribuye indirectamente junto con otros disacáridos a mantener el turgor celular aumentando los niveles endógenos de glutamato y NAGGN (Gouffi *et al.*, 1999). Es probable que la mayoría de los rizobios tengan tres rutas biosintéticas de trehalosa (OtsAB, TreYZ y TreS). Desde que muchos de los genomas de estas bacterias han sido secuenciados, se ha podido observar la anotación de genes que codifican enzimas “putativas” pertenecientes a estas tres rutas. Así, estos genes han sido anotados en las secuencias genómicas de *Rhizobium etli* CFN42 (González *et al.*, 2006), *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001), *Sinorhizobium medicae* (Copeland *et al.*, 2006), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Young *et al.*, 2006) y *B. japonicum* USDA110 (Kaneko *et al.*, 2002). Sin embargo, en la secuencia parcial del genoma de *Rhizobium* sp. NGR234 (Streit *et al.*, 2004) se han detectado los posibles genes *otsA*, *otsB* y *treY* y en *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000) únicamente ha sido identificada la ruta OtsAB. Además, se han determinado actividades enzimáticas OtsAB, TreYZ y TreS en *B. japonicum* y *B. elkanii*, actividad TreYZ en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y actividad OtsAB en *S. meliloti* (Streeter y Gómez, 2006). Asimismo, se ha observado el papel de los genes *otsA* y *treY* en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, de tal modo que un doble mutante *otsA treY* tiene reducida la capacidad para acumular trehalosa y, a pesar de formar nódulos fijadores de nitrógeno con su planta hospedadora (*T. repens*), es mucho menos competitivo para la nodulación con respecto a su cepa parental. En esta bacteria, la expresión de los genes *otsA* y *treY* parece constitutiva a lo largo de toda la curva de crecimiento, sugiriendo que la acumulación de trehalosa estaría regulada a nivel postranscripcional o por el control de la degradación del disacárido (McIntyre *et al.*, 2007).

Por último, si bien un estudio transcriptómico de *S. meliloti* 1021 en respuesta a un choque osmótico (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006) había revelado previamente la inducción de varios genes relacionados con las rutas biosintéticas de este disacárido,

recientemente, Domínguez y colaboradores (2009) investigaron el papel de la síntesis de trehalosa endógena en la tolerancia a estrés osmótico de este rizobio. En este trabajo, se realizó la caracterización tanto genética como funcional de los tres sistemas de biosíntesis de trehalosa (OtsA, TreYZ y TreS) y se estudió su papel en la nodulación con raíces de alfalfa, observándose que la ruta OtsA fue la más importante en la acumulación de trehalosa en todas las condiciones ensayadas y por tanto el principal sistema implicado en la osmoadaptación de *S. meliloti* 1021. Sin embargo, los otros dos sistemas (TreYZ y TreS) también se encontraban implicados en el proceso de osmoadaptación. Además, la expresión de los genes que codifican los tres sistemas aumentó en respuesta a un choque osmótico. Finalmente, estos autores señalaron que la presencia de al menos un sistema implicado en la síntesis de trehalosa es necesario para la efectiva competitividad de *S. meliloti* 1021 durante la nodulación en raíces de alfalfa.

1.2. Transporte y utilización de trehalosa en *S. meliloti*.

Hasta el momento, los estudios sobre el catabolismo de la trehalosa en organismos que presentan interacciones simbióticas y patogénicas han sido muy escasos y se sabe muy poco acerca de la función biológica que desempeña la utilización de este disacárido en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. En el genoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021, se identificaron dos sistemas de transporte de trehalosa de tipo ABC. El primero es un sistema implicado en el transporte de sacarosa, maltosa y trehalosa, y está codificado en el operón *aglEFGAK* (Willis y Walker, 1999). El segundo sistema fue identificado por Jensen y colaboradores (2002), y está codificado en el plásmido pSymb por 7 genes *thuREFGKAB*, de los cuales *thuEFGK* codificarían un transportador de tipo ABC implicado también en la captación de trehalosa, maltosa y sacarosa. El empleo de mutantes defectuosos en ambos sistemas de transporte mostró que el sistema *thuEFGK* se induce principalmente por trehalosa, mientras que la sacarosa (y en menor medida trehalosa) es el principal inductor del sistema formado por el operón *aglEFGAK*. Además, estos mutantes no presentaron diferencias con la cepa parental en la nodulación y fijación de nitrógeno, aunque si mostraron defectos en la colonización de raíces de alfalfa.

Jensen y colaboradores (2005) postularon que las enzimas que constituyen la principal ruta asimilatoria de trehalosa en *S. meliloti* están codificadas por los genes *thuA* y *thuB*, que son inducibles por trehalosa y se expresan en las bacterias de la zona de infección del nódulo pero no en la zona simbiótica. Los mutantes en estos

genes fueron incapaces de crecer en medios con trehalosa como única fuente de carbono. A pesar de que mostraron importantes dificultades en la colonización de las raíces de alfalfa, las cepas mutantes fueron mucho más competitivas que la cepa parental para la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. La mayor competitividad de estos mutantes podría ser debido a que la acumulación intracelular de trehalosa mejoraría la respuesta de las bacterias para enfrentarse a los distintos tipos de estrés con los que se encuentran durante el proceso de infección (Jensen *et al.*, 2005). Por último, *thuA* y *thuB* son dos genes localizados aguas abajo del operón *thuEFGK* y codifican dos proteínas de función desconocida. Estas proteínas no muestran homología con ninguna otra enzima de la ruta del catabolismo de la trehalosa. ThuA parece ser una posible glutamina amidatransferasa que posee bastante similitud con proteínas también de función desconocida de *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Brucella melitensis*, mientras que ThuB presenta homología con deshidrogenasas dependientes de NAD(H).

Recientemente, se ha estudiado la capacidad de colonización y nodulación de un mutante *thuB* de *S. meliloti* en raíces de *M. sativa* y *M. truncatula*. La coinoculación con la cepa parental (1021) permitió observar mayor proporción de nódulos ocupados por la cepa mutante en dos líneas de alfalfa y en uno de los cultivares de *M. truncatula* ensayados. Estos resultados indican que la competitividad del mutante en el gen *thuB* en comparación con *S. meliloti* 1021 depende del genotipo del hospedador (Ampomah *et al.*, 2008). También se estudió el comportamiento de un mutante en el gen ortólogo *thuB* de *Sinorhizobium medicae* con los mismos cultivares que fueron ensayados para *S. meliloti*, confirmándose que la incapacidad para utilizar trehalosa en distintas especies de *Sinorhizobium* conlleva un aumento de su competitividad para formar nódulos en determinados genotipos de plantas hospedadoras (Ampomah *et al.*, 2008).

1.3. Cambios en las envueltas celulares en rizobios en condiciones de estrés.

Se sabe que las células bacterianas remodelan su pared celular al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, durante la infección de fagos, la adhesión a superficies y la entrada en células hospedadoras (Stokes, 2003; Arisaka *et al.*, 2003; Quintela *et al.*, 1997). Del mismo modo, modifican la composición de su envoltura celular en respuesta a otros estreses abióticos como son los cambios en el pH externo y la temperatura (Booth, 1985). Cambios en la morfología y el tamaño celular o modificaciones en el patrón de polisacáridos extracelulares (EPS) y lipopolisacáridos

(LPS) también son algunas de las respuestas que tienen lugar en los rizobios sometidos a un estrés osmótico (Lloret *et al.*, 1995; Soussi *et al.*, 2001).

Los polisacáridos bacterianos son necesarios durante las interacciones simbióticas *Rhizobium*-leguminosas. A pesar de que muchas de las funciones de estas moléculas no han sido investigadas aún, los exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares y los β -glucanos cíclicos desempeñan un papel muy importante durante el desarrollo de los nódulos (Kannenberg y Brewin, 1994). Asimismo, a través de numerosos trabajos es conocida la importancia de estos compuestos en la adaptación y supervivencia de las especies de *Rhizobium* a diferentes condiciones medioambientales, tanto en vida libre como en simbiosis. Se ha descrito, por ejemplo, que la acumulación de β -glucanos cíclicos en el espacio periplásmico tiene lugar en condiciones hipoosmóticas (Dylan *et al.*, 1990) y que alteraciones en el LPS pueden ocurrir también en respuesta a la variación de oxígeno, pH ácido, estrés osmótico e iónico y en respuesta a la presencia de inductores de plantas de genes *nod* (Kannenberg y Brewin, 1989; Lloret *et al.*, 1995; Tao *et al.*, 1992; Reuhs *et al.*, 1994). En relación a los exopolisacáridos, *S. meliloti* produce dos tipos; EPS-I y EPS-II. El primero, también llamado succinoglucano (del que existe una forma de alto y otra de bajo peso molecular), se requiere principalmente para la elongación y colonización del tubo de infección. La mayoría de los estudios fisiológicos y genéticos realizados con cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 indican que en condiciones normales únicamente produce EPS-I (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan *et al.*, 1989). Por su parte el EPS-II, o galactoglucano, de la mayoría de las cepas de *S. meliloti* no se sintetiza en vida libre, pero su producción se induce en condiciones de escasez de fosfato (Zhan *et al.*, 1991). Igualmente, la cepa halotolerante EFB1 de *S. meliloti* produce galactoglucano, cuya síntesis disminuye al aumentar la concentración de sal en el medio de cultivo. La diferencia en la producción de este exopolisacárido en presencia o ausencia de sal es un fenómeno que está regulado a nivel transcripcional (Lloret *et al.*, 1998). La reciente identificación de una glicosiltransferasa putativa codificada por el gen SMb21071 de *S. meliloti* ha puesto de manifiesto la importancia del gen en la osmoadaptación de la bacteria, así como su implicación en el mantenimiento y/o modificación de polisacáridos de superficie en respuesta a estrés osmótico (Reguera *et al.*, 2009).

1.4. Factores de transcripción en *Sinorhizobium meliloti*.

La adecuada respuesta al estrés es un requisito importante para garantizar la supervivencia de los rizobios tanto en vida libre (en la rizosfera) como en simbiosis. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de regulación de esta respuesta en este tipo de bacterias. Hasta la fecha, no se han encontrado homólogos de σ^S en el genoma de la mayoría de los rizobios que pertenecen a la subdivisión α -proteobacteria. Este dato indicaría la posible existencia de otro tipo de reguladores implicados en la respuesta a estrés general. En cambio, existe un gran número de factores sigma de la subfamilia ECF codificados en los genomas de rizobios, pero se sabe muy poco acerca de sus posibles funciones. En el genoma de *S. meliloti* 1021 aparecen anotados 11 factores de transcripción con posible función extracitoplasmática, entre ellos seis copias del factor σ^E (RpoE), además de otros reguladores que podrían participar en la respuesta a diversos estímulos (Galibert *et al.*, 2001; Staron' *et al.*, 2009).

Los primeros pasos para entender la respuesta a estrés general en *Rhizobium* se han llevado a cabo mediante la realización de estudios transcriptómicos con *S. meliloti* en respuesta a diferentes tipos de estreses (Becker *et al.*, 2004; Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006; Sauviac *et al.*, 2007). Las copias *rpoE2* y *rpoE5* aparecieron inducidas tras un choque osmótico en *S. meliloti* (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). Además, Sauviac y colaboradores observaron que *rpoE2* también aparecía inducido en condiciones de estrés térmico y al comienzo de la fase estacionaria. Estos autores identificaron aproximadamente 60 genes regulados, de los que, más de un tercio estaban bajo el control del gen *rpoE2*, entre ellos, los genes *katC*, *rpoH2* y *rpoE5*. De este modo, apuntaron al factor sigma RpoE2 como el mayor regulador de la respuesta a estrés general en esta bacteria. A pesar de estos resultados, estos autores observaron que mutantes *rpoE2* no mostraron fenotipo ni en vida libre ni en simbiosis en comparación con la cepa parental.

No obstante, Flechard y colaboradores (2009) observaron que el gen *rpoE2* de *S. meliloti* es necesario para la producción durante la fase estacionaria de crecimiento de las enzimas SOD y KatC encargadas de la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y aumento de la resistencia celular a H₂O₂. Asimismo, demostraron la importancia del factor alternativo RpoE2 en osmoadaptación (Flechard *et al.*, 2010). La construcción y caracterización de un mutante *rpoE2* de *S. meliloti*, reveló un defecto en el crecimiento de la bacteria en medios hiperosmóticos, indicando además que los problemas de crecimiento en este mutante se deben a la ausencia de trehalosa. Si

bien la expresión de las tres rutas de síntesis de trehalosa depende de RpoE2, es la ruta OtsA la que más se induce por RpoE2 en condiciones hiperosmóticas. Recientemente, se han investigado los mecanismos de transducción de señales que activan el factor RpoE2 de *S. meliloti* en respuesta a estrés (Bastiat *et al.*, 2010). Los resultados de este estudio genético y bioquímico revelaron que la actividad de RpoE2 está negativamente controlada por dos factores anti-sigma parálogos, RsiA1 y RsiA2, y positivamente regulada por dos reguladores de respuesta de dos componentes de tipo PhyR, RsiB1 y RsiB2. Estos últimos son dos factores anti-anti-sigma parálogos que en su forma fosforilada estarían interaccionando con las proteínas RsiA1 y RsiA2. Estos autores proponen un mecanismo de activación de RpoE2 en respuesta a estrés para *S. meliloti* muy similar a los modelos de regulación de *Methylobacterium extorquens* y *B. japonicum* (Francez-Charlot *et al.*, 2009; Gourion *et al.*, 2009; Gourion *et al.*, 2008) (Figura I.14).

Por otro lado, en *S. meliloti* existen dos copias del gen *rpoH* (*rpoH1* y *rpoH2*) que codifica el factor de transcripción de choque térmico σ^{32} (Oke *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2001) y, aunque sus productos muestran una identidad de secuencia del 43%, son funcionalmente distintos. Mutantes en el gen *rpoH1* de *S. meliloti* son más sensibles a altas temperaturas, pH ácido y otros agentes. A pesar de formar nódulos con alfalfa, presentan una eficiencia de fijación de nitrógeno reducida. La transcripción de genes como *groESL5*, *lon* y *clpB* después de un choque térmico también es dependiente de RpoH1 (Mitsui *et al.*, 2004). Al contrario que RpoH1, RpoH2 es necesario para la tolerancia a sal e importante durante la fase estacionaria de crecimiento, pero no parece importante para el establecimiento de la simbiosis con la planta hospedadora (Tittabutr *et al.*, 2006). La presencia de dos copias del gen *rpoH* también ha sido detectada en bacterias como *Brucella melitensis* y *Rhodobacter sphaeroides*, (Delory *et al.*, 2006; Green y Donohue, 2006) así como en los rizobios *M. loti* y *R. etli* (González *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2000; Martínez-Salazar *et al.*, 2009), mientras que en *Bradyrhizobium japonicum* se han identificado hasta tres copias del gen *rpoH* (Narberhaus *et al.*, 1997).

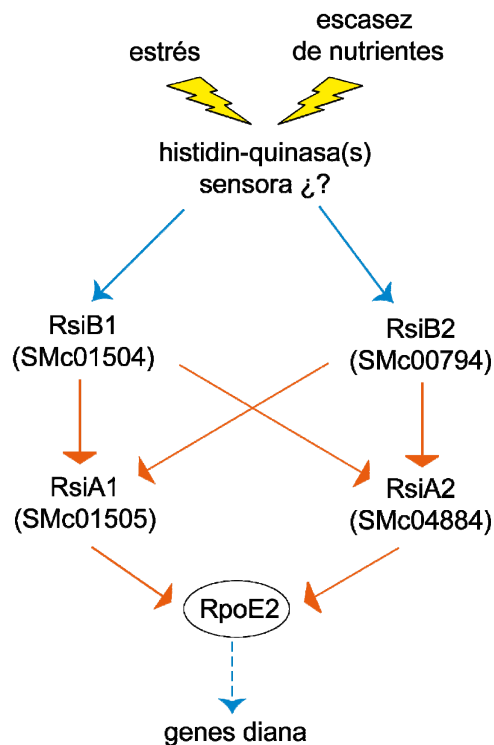


Figura I.14. Modelo de activación de RpoE2 en respuesta a estrés propuesto para *S. meliloti* 1021. En condiciones normales RpoE2 se encuentra en forma inactiva por la interacción con los factores anti-sigma RsiA1 y RsiA2. En condiciones de escasez de nutrientes o estrés, una o varias histidín-quinasa no identificadas detectan los estímulos y fosforilan a RsiB1 y/o RsiB2. En consecuencia, el dominio amino “efector” de estas proteínas se activa y entra en contacto con RsiA1 y/o RsiA2, aliviando el efecto inhibitorio sobre RpoE2. Las flechas azules y rojas representan el tipo de regulación positiva o negativa, respectivamente (Bastiat *et al.*, 2010).

1.5. Análisis del transcriptoma de *Sinorhizobium meliloti* en respuesta a un choque osmótico.

Aunque la utilización de microarrays del genoma de *S. meliloti* 1021 para determinar los cambios en la expresión en respuesta a algunos estreses abióticos es una técnica que ya había sido previamente empleada por algunos investigadores (Krol y Becker, 2004; Ruberg *et al.*, 2003), Domínguez y colaboradores (2006) pretendieron obtener una visión más detallada de la respuesta temprana de esta bacteria a un choque osmótico. En este estudio, el principal objetivo fue la comparación de la respuesta transcripcional a un incremento de la osmolaridad ocasionado por una elevada salinidad u osmolaridad. Se obtuvieron claras evidencias de que ambos tipos de estrés desencadenaban respuestas altamente solapantes. La redundancia general

en los genes diferencialmente expresados tras la adición de sacarosa o NaCl constituyó una validación de los resultados obtenidos.

Un total de 1003 genes (el 16% de los genes anotados en el genoma de *S. meliloti* 1021) fueron finalmente considerados como diferencialmente expresados. De los 1003 genes, 539 fueron genes inducidos y 444 reprimidos. Los 20 genes restantes aparecieron como inducidos o reprimidos según el momento. Más del 40% de los genes diferencialmente expresados formaban parte de supuestos operones en los que dos o más genes aparecieron osmorregulados en las condiciones que fueron ensayadas. Asimismo, la mayoría de los genes identificados en este estudio presentaron una respuesta transitoria al choque osmótico, de tal modo que tras 4 horas de exposición sólo 507 (51%) de los 1003 genes descritos como de respuesta a estrés osmótico, se mantenían diferencialmente expresados en cualquiera de las condiciones ensayadas.

Cuando se estudió la distribución en categorías funcionales de los genes osmorregulados por la adición de NaCl o sacarosa al medio de cultivo, se observó la inducción de un gran número de genes de función desconocida y la represión de muchos genes que codifican proteínas de función conocida, relacionadas en su mayor parte con la ralentización del crecimiento celular y la disminución de la biosíntesis de proteínas que son características de las células estresadas.

En *S. meliloti* se observó una inhibición de muchas funciones del metabolismo central y los sistemas de producción de energía; la represión del ciclo de los ácidos tricarboxílicos junto con varias enzimas glucolíticas (*cbbA*, *pdhB*, *pgi*), de genes relacionados con la captación y metabolismo del manitol, de distintos complejos de la cadena respiratoria y funciones asociadas, así como de muchos genes relacionados con la captación de metales (manganeso, hierro y rizobactina). Se produjo una inhibición general de la síntesis protéica tras un choque osmótico, reprimiéndose un alto porcentaje de los genes que codifican proteínas ribosómicas y posibles factores de elongación (*tufA*, *fusA1* y *tufB*). También la represión de genes relacionados con la replicación y segregación cromosómica (*smc*, *ftsK*, *dnaN*, *dnaA*, y *ruvA*). En relación con las envueltas celulares, se observó la represión de genes implicados en la producción del polisacárido capsular (KPS) (*rkpA* y *rkpK*), síntesis del peptidoglucano (*murACG*) y con el transporte de β -glucanos cíclicos periplásmicos (*ndvA*). En el caso de estos últimos, se ha visto previamente que se acumulan en respuesta a un descenso de la osmolaridad externa (Bohin, 2000). Finalmente, hasta 27 genes implicados en quimiotaxis y motilidad celular redujeron su expresión tras un choque osmótico. Entre ellos, genes relacionados con la biosíntesis del flagelo, reguladores,

además de genes del motor flagelar y una gran cantidad de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos.

Por otro lado, entre los genes más relevantes que aparecieron diferencialmente expresados en relación con el metabolismo en estrés, destaca la inducción de aquellos que ya se habían descrito con anterioridad como genes de respuesta a estrés, como por ejemplo, los genes *ndi* (*ndiA1*, *ndiA2* y *ndiB*), una posible dioxigenasa (SMa1814), el gen *sodC* (cupro zinc superóxido dismutasa) y el *katC* (catalasa). También se detectó la inducción de genes relacionados con procesos de reparación de ADN (posibles ADN ligasas, ADN polimerasa, ADN invertasa y una probable exodesoxirribonucleasa de tipo III). Asimismo, se observó la inducción tras un choque osmótico de varios genes que codifican factores sigma de transcripción y que están relacionados con el estrés térmico (*rpoE2*, *rpoE5* y *rpoH2*). En relación con el metabolismo de trehalosa, se pudo apreciar la inducción de los genes que codifican las tres rutas de biosíntesis de este disacárido (*otsA*, *treY* y *treS*) más comunes descritas en bacterias, así como la inducción de los genes implicados en el transporte y utilización de trehalosa (*thuA*, *thuE* y *thuG*). La inducción de genes posiblemente implicados en la biosíntesis de glutamato tras el choque osmótico (SMc01813 y *asnO*) también fue observada.

Por otro lado, se observó una fuerte desviación en la distribución entre los distintos replicones de *S. meliloti* 1021 de los genes que respondieron a estrés osmótico. La mayoría de los genes reprimidos (85%) se encontraban localizados en el cromosoma mientras que la mayoría de los genes inducidos se localizaban en alguno de los plásmidos simbióticos (pSyms) y de forma muy significativa en el plásmido pSymB. El hecho de que el 83% de los genes de pSymB diferencialmente expresados se encontraran inducidos con respecto a las condiciones control, condujo a la hipótesis de la implicación de este plásmido en la adaptación de *S. meliloti* a estrés osmótico.

OBJETIVOS

La salinidad en el suelo y aguas de riego, así como la prevalencia de períodos de déficit hídrico, tienen efectos adversos sobre los cultivos agrícolas, especialmente en zonas áridas o semiáridas. En estas condiciones, el crecimiento de la planta está condicionado por una menor disponibilidad de agua (estrés osmótico) y en el caso de la salinidad, un desequilibrio nutricional provocado por la toxicidad iónica específica. El exceso de sales en el suelo también constituye un factor limitante para el crecimiento y actividad de las bacterias del suelo que forman simbiosis con las leguminosas, colectivamente llamadas rizobios (Ashraf y Harris, 2004).

Es conocido que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa suele ser más sensible al estrés osmótico que los simbioses separadamente (Zahran, 1999). El incremento en la osmolaridad extracelular inhibe el crecimiento y la supervivencia de la bacteria en el suelo, afecta al proceso de infección y desarrollo del nódulo, a su funcionamiento y, por tanto, a la capacidad fijadora de nitrógeno. Del mismo modo, estos estreses limitan el crecimiento y desarrollo vegetal, por lo que su adaptación a estas condiciones depende de la activación de cascadas reguladoras implicadas en la percepción del estrés, transducción de señales y la expresión de genes y metabolitos específicos (Vinocur y Altman, 2005).

Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio evidenciaron que la capacidad de adaptación de la bacteria a estrés salino y osmótico influye sobre el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. Se observó que genes de la bacteria necesarios para la adaptación en vida libre a estrés salino y osmótico están también involucrados en la simbiosis (Nogales *et al.*, 2002). Recientemente, se ha podido determinar la existencia de varios sistemas de transporte de K^+ en rizobios, que son necesarios para la tolerancia al estrés osmótico e importantes también para la eficiencia simbiótica (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009a). Además de estos resultados, en nuestro laboratorio se ha podido establecer que la capacidad de los rizobios para biosintetizar y acumular trehalosa endógenamente es muy importante para su capacidad de osmoadaptación en vida libre, así como para su óptimo comportamiento en simbiosis con leguminosas (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009b).

Otros autores han relacionado la presencia de trehalosa en el nódulo con condiciones de estrés osmótico, observando un aumento del contenido de trehalosa en nódulos de algunas leguminosas en respuesta a NaCl (Farias-Rodríguez *et al.*, 1998; Fougère *et al.*, 1991; Müller *et al.*, 1995). Además, un aumento de trehalosa en nódulos, inducido por tratamiento farmacológico, se correlaciona con una mejora del crecimiento de *L. japonicus* en condiciones de salinidad (López *et al.*, 2006). Así pues, la trehalosa nodular podría jugar un papel importante para aumentar la resistencia de

la planta frente a situaciones adversas. En *R. etli*, la sobreexpresión del gen *otsA* conduce a una mayor acumulación de trehalosa en los nódulos de *P. vulgaris* y a una mayor tolerancia de la planta al estrés hídrico (Suárez *et al.*, 2008). La acumulación de trehalosa en bacterias del género *Azospirillum* también mejora la tolerancia a estrés hídrico e implica un aumento de biomasa en plantas de maíz (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009). Finalmente, se sabe que mutantes de *S. meliloti* incapaces de transportar y catabolizar trehalosa son más competitivos que la cepa parental, aunque no se encuentra afectada su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno (Jensen *et al.*, 2002; 2005).

En consecuencia, todos estos autores consideran que el aumento de la capacidad de acumulación de trehalosa por la bacteria posibilita incrementar su tolerancia frente a estreses abióticos, así como un aumento de la eficiencia simbiótica y con ello un mejor crecimiento y desarrollo de la planta, particularmente en condiciones de estrés.

En nuestro laboratorio también se realizó un estudio del transcriptoma de *S. meliloti* en respuesta a choque osmótico en vida libre, identificándose varios cientos de genes cuyos niveles de expresión cambiaban como consecuencia de este estrés (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos indicaban que la mayoría de los genes con expresión aumentada tras choque osmótico se localizaban en uno de los plásmidos simbióticos de esta bacteria (pSymB), junto a muchos otros determinantes de simbiosis y supervivencia en rizosfera.

Con estos antecedentes, el objetivo general de esta tesis doctoral fue el de seguir profundizando en la caracterización de los mecanismos de osmotolerancia de *Rhizobium* y de su importancia en simbiosis con la leguminosa hospedadora, tanto mecanismos previamente identificados en otros organismos, como la identificación de mecanismos novedosos.

Así, los objetivos parciales de este trabajo fueron:

1) Determinar la importancia de la acumulación de trehalosa para la osmotolerancia de *Sinorhizobium meliloti* y para el funcionamiento de la simbiosis con *M. sativa* bajo estrés salino, manipulando tanto la biosíntesis como la degradación de trehalosa.

2) Determinar el papel del plásmido simbiótico pSymB de *S. meliloti* en la osmoadaptación de esta bacteria, y la identificación de los genes localizados en dicho plásmido que son importantes para este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, aparecen listados en las Tablas M.1 y M.2, respectivamente.

Tabla M.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características relevantes	Referencias
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
GR4	Cepa silvestre, Nod ⁺ , Fix ⁺ en alfalfa, contiene los plásmidos pSymA, pSymB, pRmeGR4 y pRme GR4b	Mercado-Blanco <i>et al.</i> 1993
2011	Cepa silvestre Sm ^r , Nx ^r	J. Dénarié, France
1021	Derivada de 2011, cepa silvestre SU47 str-21, Sm ^r	Meade <i>et al.</i> , 1982
Cepas derivadas de 1021		
Rm5378	$\Delta\Omega$ 5020-5011::Tn5-oriT, Nm ^r	Finan <i>et al.</i> , 1988
Rm5408	$\Delta\Omega$ 5033-5007::Tn5-233, Gm ^r , Spc ^r	Charles y Finan, 1991
RmF117	$\Delta\Omega$ 5060-5033::Tn5-233, Gm ^r , Spc ^r	Charles y Finan, 1991
RmF638	$\Delta\Omega$ 5145-5061::Tn5-233, Gm ^r , Spc ^r	Charles y Finan, 1991
RmF666	$\Delta\Omega$ 5146-5111::Tn5-233, Gm ^r , Spc ^r	Charles y Finan, 1991
RmF680	$\Delta\Omega$ 5085-5061::Tn5-233, Gm ^r , Spc ^r	Charles y Finan, 1991
RmF693	$\Delta\Omega$ 5085-5142::Tn5-233, Gm ^r , Spc ^r	Charles y Finan, 1991
RmF728	$\Delta\Omega$ 5177-lac-56::Tn5, Nm ^r	Charles y Finan, 1991
RmF909	$\Delta\Omega$ 5085-5047::TnV, Nm ^r	Charles y Finan, 1991
RmG506	Ω 5040::Tn5-233 AG506, Gm ^r , Spc ^r , sacarosa ^r	Charles y Finan, 1991
RmF514	$\Delta\Omega$ 5061-5047::Tn5-1l, Gm ^r , Spc ^r	Charles y Finan, 1991
Rm8002	Derivada de 1021 Pho ⁻ , Sm ^r	Long <i>et al.</i> , 1988
1021(<i>ino1</i> ⁻)	Derivada de 1021, Δ SMb20249::Sm/Spc, Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
1021(<i>rpoE5</i> ⁻)	Derivada de 1021, Δ rpoE5::Sm/Spc, Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
SMb20968 ⁻	Derivada de 1021, Δ SMb20968::Sm/Spc, Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
1021(092 ⁻)	Derivada de 1021, Δ SMb21092::Sm/Spc, Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo

091 ⁻ (pCH091)	Derivada de 1021, SMb21091::pCHESI-zKm, Sm ^r , Km ^r	Este trabajo
091 ⁻ (pS091)	Derivada de 1021, SMb21091::pSUP202pol4, Sm ^r , Tc ^r	Este trabajo
091 ⁻ (pJB1,6)/ 091 ⁻ c	Derivada de 091 ⁻ (pCH091) que porta el plásmido pJB1,6, Sm ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabajo

Cepas derivadas de Rm2011

SMb20487 ⁻	2011mTn5STM.1.06.E07	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20520 ⁻	2011mTn5STM.4.13.E12	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20522 ⁻	2011mTn5STM.2.05.G10	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20534 ⁻	2011mTn5STM.1.05.H03	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20535 ⁻	2011mTn5STM.1.13.H05	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20536 ⁻	2011mTn5STM.2.11.A10	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20537 ⁻	2011mTn5STM.4.11.D04	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20538 ⁻	2011mTn5STM.3.03.D12	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20541 ⁻	2011mTn5STM.3.01.B02	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20555 ⁻	2011mTn5STM.3.07.E02	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21030 ⁻	2011mTn5STM.2.01.C07	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21044 ⁻	2011mTn5STM.3.02.F10	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21059 ⁻	2011mTn5STM.3.04.E11	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21069 ⁻	2011mTn5STM.3.02.E08	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21073 ⁻	2011mTn5STM.2.12.F09	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20099 ⁻	2011mTn5STM.2.04.B12	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20968 ⁻	2011mTn5STM.4.05.C09	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20345 ⁻	2011mTn5STM.1.09.E08	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb20346 ⁻	2011mTn5STM.5.05.G02	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21448 ⁻	2011mTn5STM.3.11.F08	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21406 ⁻	2011mTn5STM.3.10.C05	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006
SMb21407 ⁻	2011mTn5STM.4.13.A04	Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006

Mesorhizobium loti

MAFF303099	Cepa silvestre	Kaneko <i>et al.</i> , 2000
------------	----------------	-----------------------------

Escherichia coli

S17-1	thi, pro, recA, hsdR, hsdM; RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
-------	--	----------------------------

DH5 α	<i>SupE44, DlacU169, f80, lacZDM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Bethesda Reseca Laboratory [®]
HB101	<i>supE44, hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5mt11, Sm^r</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969B
CC118	$\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE (Sp^r) rpoB (Rif^r) argE recA1$	Manoil y Beckwith, 1985

Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características relevantes	Referencias
pUC18	Vector de clonación, Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pGEM-T Easy	Vector de clonación para fragmentos amplificados de PCR, Ap ^r	Promega [®]
pHP45 Ω	Plásmido portador de un interposón Sm/Spc ^r , Ap ^r	Prentki y Krisch, 1984
pSUP202pol4	Vector suicida derivado de pSUP202, Tc ^r	Simon <i>et al.</i> , 1983
pCHESI- \check{z} Km	Vector suicida derivado de pUN \emptyset 18	Llamas <i>et al.</i> , 2003
pJB3Tc19	Vector de clonación IncP derivado de RK2, Mob ⁺ , Tc ^r , Ap ^r	Blatny <i>et al.</i> , 1997
pUCH218	Derivado de pUC18 que contiene un fragmento de 2,4 Kb con el gen <i>phoA</i> de <i>E. coli</i>	Strom y Lory, 1987
pBBR1MCS5	Vector de clonación con α -complementación, oriTRK2, Gm ^r	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS53/p53gus	Derivado de pBBR1MCS5 con el gen <i>gusA (uidA)</i> de pWM5 (pBBR1MCS:: <i>uidA</i>)	L. Girard (CIFN)
pLAFR1	Cósmido IncP, Tc ^r	Ditta <i>et al.</i> , 1980
pRK2013	Plásmido movilizador derivado de RK2, Km ^r	Figurski y Helinski, 1979
cos17, cos21, cos23	Cósmidos derivados de pLAFR1 que permiten crecimiento de RmF514 en medio salino	cos17, cos21, cos23
cos3, cos15, cos5	Cósmidos derivados de pLAFR1 que permiten crecimiento de RmF514 en medio salino	cos3, cos15, cos5
pUC7,6-1	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> de 7,6 Kb (729017-736681 de pSymB) común en los cósmidos cos3, 15 y 5, Ap ^r	Este trabajo
pUC7,6-2	Similar a pUC7,6-1 pero con el fragmento de 7,6 Kb clonado en orientación inversa.	Este trabajo
pJB7,6-1	Derivado de pJB3Tc19 que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> de 7,6 Kb procedente de pUC7,6-1, Tc ^r	Este trabajo

Materiales y Métodos

pJB7,6-2	Similar a pJB7,6-1 pero con el el fragmento <i>EcoRI</i> de 7,6 Kb clonado en orientación inversa, Tc ^r	Este trabajo
pJB5,2	Derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento <i>KpnI</i> de 5,2 Kb procedente de pJB7,6-1, Tc ^r	Este trabajo
pJB3,1	Derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento <i>SacI</i> de 3,1 Kb procedente de pUC7,6-1, Tc ^r	Este trabajo
pGlysR	Derivado de pGEM-T Easy que contiene un fragmento del gen SMb21093 de 1 Kb (735322-736400 de pSymB) amplificado de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo
pJBlysR	Derivado de pJB3Tc19 que porta un fragmento <i>XbaI/BamHI</i> de 1 Kb procedente de pGlysR, Tc ^r	Este trabajo
pJB1,89	Derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento <i>HindIII</i> de 1,89 Kb procedente de pJB3,1, Tc ^r	Este trabajo
ΔpJ1,89	Derivado de pJB1,89 que contiene una delección <i>NotI/NotI</i> de 163 pb, Tc ^r	Este trabajo
pG1,6lysM	Derivado de pGEM-T Easy con un fragmento 1,6 Kb (733374-735002 de pSymB) de <i>S. meliloti</i> que contiene <i>satM</i> , Ap ^r	Este trabajo
pJB1,6	Derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento <i>XbaI/EcoRI</i> de 1,6 kb procedente de pG1,6lysM, Tc ^r	Este trabajo
pG091(SI)	Derivado de pGEM-T Easy que porta un fragmento de 412 pb (734237-734649 de pSymB) que contiene <i>satM</i> de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo
pCH091	Derivado de pCHESI-zKm que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de 412 pb procedente de pG091(SI), Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pS091	Derivado de pSUP202pol4 que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de 412 pb procedente de pG091(SI), Tc ^r	Este trabajo
pG21092	Derivado de pGEMT-Easy que contiene un fragmento de SMb21092 de 2,3 Kb (733984-736339 de pSymB) amplificado de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo
pG21092SS	Derivado de pG21092 que contiene el cassette de Sm/Spc clonado en los sitios <i>XhoI/Ascl</i> , Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
pS21092SS	Derivado de pSUP202pol4 que contiene un fragmento <i>XbaI/EcoRI</i> de un tamaño de 3,4 Kb procedente de pG21092SS, Sm ^r , Spc ^r , Tc ^r	Este trabajo
pGlysM(phoA)	Derivado de pGEM-T Easy que contiene un fragmento de 179 pb (733827-734005 de pSymB) del gen SMb21091 amplificado de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo

pUCHlysM	Derivado de pUCH218 que contiene un fragmento <i>KpnI/SalI</i> procedente de pGlysM(phoA) y clonado delante del gen ' <i>phoA</i> , Ap ^r	Este trabajo
pBBRlysM	Derivado de pBBRphoA que contiene un fragmento <i>KpnI/SalI</i> procedente de pGlysM(phoA) y clonado delante del gen ' <i>phoA</i> , Gm ^r	Este trabajo
pG092(phoA)	Derivado de pGEM-T Easy que contiene un fragmento amplificado de 537 pb (734848-735385 de pSymB) del gen SMb21092, Ap ^r	Este trabajo
pUCH092	Derivado de pUCH218 que contiene un fragmento <i>KpnI/SalI</i> procedente de pG092(phoA) y clonado delante del gen ' <i>phoA</i> , Ap ^r	Este trabajo
pBBR092	Derivado de pBBRphoA que contiene un fragmento <i>KpnI/SalI</i> procedente de pG092(phoA) y clonado delante del gen ' <i>phoA</i> , Gm ^r	Este trabajo
p53lysM	Fusión <i>satM::gusA</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 en pBBR1MCS53 clonado <i>XbaI/BamHI</i> , Gm ^r	Este trabajo
pGtreF	Derivado de pGEMT-Easy que contiene un fragmento de 3,2 Kb con el gen SMb20968 (1196642-1199890 de pSymB) amplificado de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo
pGtreFInv	Derivado de pGtreF que contiene una delección de 1,15 Kb y dos dianas <i>SmaI</i> por amplificación inversa, Ap ^r	Este trabajo
pGtreFSS	Derivado de pGtreFInv que contiene un casete de Sm/Spc en los sitios <i>SmaI</i> , Ap ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
pStreFSS	Derivado de pSUP202po4 que porta el inserto <i>EcoRI</i> procedente de pGtreFSS, Tc ^r , Sm ^r , Spc ^r	Este trabajo
pJBtreF	Derivado de pJB3Tc19 que contiene el fragmento <i>SphI/BamHI</i> de 2,89 Kb procedente de pGtreF, Tc ^r	Este trabajo
pGotsAexp	Derivado de pGEMT-Easy que contiene un fragmento de 2,3 Kb con el gen <i>otsA</i> (128911-131290 de pSymA) de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo
pJBotsA	Derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento <i>HindIII/XbaI</i> procedente de pGotsAexp, Tc ^r	Este trabajo
pGtreYexp	Derivado de pGEMT-Easy que contiene un fragmento de 3,2 Kb del gen <i>treY</i> (1586701-1589968 de pSymB) de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo
pJBtreY	Derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento <i>XbaI/BamHI</i> procedente de pGtreYexp, Tc ^r	Este trabajo
pGtreSexp	Derivado pGEMT-Easy que contiene un fragmento de 2,4 Kb con el gen <i>treS</i> (106949-109339 de pSymB) de <i>S. meliloti</i> , Ap ^r	Este trabajo

Materiales y Métodos

pJBtreS	Derivado de pB3Tc19 que contiene un fragmento <i>XbaI/EcoRI</i> procedente de pGtreSexp, Tc ^r	Este trabajo
pGotsA/Bexp	Derivado de pGEMT-Easy que contiene un fragmento de 2,9 Kb con los genes <i>otsA</i> y <i>otsB</i> de <i>M.loti</i> MAFF303099, Ap ^r	Este trabajo
pJBotsA/B	Derivado de pB3Tc19 que contiene un fragmento <i>BamHI/HindIII</i> procedente de pGotsA/Bexp, Tc ^r	Este trabajo

2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.

2.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C tanto en medio líquido como sólido utilizando el medio de Luria-Bertani, LB (Miller, 1972):

Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agua desionizada.....	1000 ml
Agar (para medio sólido).....	15 g

El medio se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

Alternativamente, cuando se ha querido seleccionar *E. coli* frente a *Rhizobium*, se ha empleado ENDO AGAR, un medio selectivo para coliformes donde no crece *Sinorhizobium meliloti* y cuya preparación se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (DIFCO): se resuspenden 41,5 gramos del preparado en un litro de agua bidestilada y se hierve hasta su completa disolución. A continuación se esteriliza durante 15 minutos a 121°C. Este medio se preparó inmediatamente antes de su utilización.

2.2. Medios de cultivo para *Rhizobium*.

Las cepas de *Rhizobium* se cultivaron de forma rutinaria a 28-30°C en medio TY (Beringer, 1974):

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5 g
Agua desionizada.....	1000 ml
Agar (para medio sólido).....	15 g

El medio se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

Como medio mínimo (MM) habitual se empleó el medio de Robertsen y colaboradores (1981) modificado:

K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Glutamato sódico.....	1,1 g
Manitol.....	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O**.....	0,15 g
CaCl ₂ .2H ₂ O**.....	0,05 g
FeCl ₃ **.....	0,006 g
NaCl**.....	0,05 g
Solución con vitaminas#.....	1 ml
Agua desionizada.....	1000 ml
Agar purificado (medio sólido).....	13 g

Se ajustó el pH a 6,8-7,2 y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

** El MgSO₄.7H₂O y los cloruros se prepararon como soluciones 100 veces concentradas, se esterilizaron por filtración y se adicionaron 10ml/litro al medio mínimo autoclavado.

#La solución concentrada de vitaminas (1000x) estuvo compuesta por:

Biotina.....	0,2 g
Tiamina.....	0,1 g
Pantotenato sódico.....	0,1 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Se esterilizó por filtración y se adicionó 1 ml/litro al medio mínimo autoclavado.

Por otro lado, se utilizó de forma ocasional para *Sinorhizobium meliloti* el medio mínimo VMM, de Vincent y colaboradores (1970) :

K ₂ HPO ₄	14,7 mM
KH ₂ PO ₄	11,5 mM
Succinato sódico.....	10 mM
NH ₄ Cl.....	15,7 mM
MgSO ₄ **.....	1 mM
CaCl ₂ **.....	0,46 mM
FeCl ₃ **.....	0,037 mM
Biotina**.....	4,1 µM
Solución con oligoelementos#.....	1 ml
Agua desionizada.....	1000 ml
Agar purificado (medio sólido).....	16 g

El MgSO₄, los cloruros, la biotina y los oligoelementos se prepararon separadamente, como soluciones 1000 veces concentradas. Se esterilizaron por filtración y se adicionaron 1ml/litro al medio mínimo autoclavado.

#La solución concentrada de oligoelementos constó de:

H ₃ BO ₃	48,5 µM
MnSO ₄	10 µM
ZnSO ₄	1 µM
CuSO ₄	0,5 µM
CoCl ₂	1 µM
Na ₂ MoO ₄	1 µM

2.3. Conservación de cepas bacterianas.

Para la conservación prolongada de las distintas cepas, cultivos en fase logarítmica adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20% fueron incluidos en criotubos con cierre hermético y se conservaron a -80°C.

2.4. Antibióticos.

Los antibióticos se prepararon como soluciones 100 veces concentradas y se esterilizaron por filtración mediante unidades Acrodisc® Syringe Filtres con Suport® Membrana (Pall), de 0,2 µm de tamaño de poro y 2,5 cm de diámetro. Todos los antibióticos fueron disueltos en agua excepto la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las concentraciones finales empleadas se indican en la tabla M.3.

Tabla M.3. Antibióticos utilizados en este trabajo.

Antibiótico	Concentración (µg/ml)		
	<i>S. meliloti</i>	<i>M. loti</i>	<i>E. coli</i>
Sulfato de estreptomycin (Sm)	200	100	50
Espectinomycin (Spc)	100	100	25
Gentamicina (Gm)	10	-	5
Sulfato de kanamicina (Km)	200	200	50
Neomicina (Nm)	100	100	25
Ampicilina (Ap)	-	-	200
Tetraciclina (Tc)	10	0,5	10
Rifampicina (Rf)	-	-	10

3. CONDICIONES DE CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

Alícuotas de los cultivos de *Rhizobium* conservados a -80°C, se inocularon en 3 ml de medio TY, con sus correspondientes antibióticos, y se incubaron a 28-30°C, en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se diluyeron (1/10-1/15) en el mismo medio de cultivo en el que se realizarían las curvas, en ausencia de antibióticos, y se incubaron en agitación hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,7-0,8. A continuación, se inocularon todas las cepas del mismo experimento con el mismo número de células (2.10⁸ ufc) haciendo diluciones de 1/80-1/100 en matraces Erlenmeyer de 100 ml que contenían 18-22 ml de medio, y se incubaron en agitación a 28-30 °C. Periódicamente se tomaron alícuotas de 1ml para determinar la densidad óptica (D.O._{600nm}) a lo largo de los cultivos.

4. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

4.1. Conjugaciones biparentales.

Se realizaron mediante mezcla de células de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento (D.O._{600nm} entre 0,4 y 0,6) del donador con células en fase exponencial tardía del receptor, en la proporción 1:1. Donador y receptor se centrifugaron en un tubo de 1,5 ml y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) con el fin de eliminar los restos de antibióticos. Finalmente, la mezcla se resuspendió en un pequeño volumen (30 μ l) de medio de cultivo y fue depositada sobre un filtro Millipore estéril (0,45 μ m de poro y 2,5 cm de diámetro), previamente colocado sobre una placa de medio sólido (generalmente en TY) y se incubó durante 16-20 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla de conjugación se resuspendió en medio líquido estéril, y se prepararon diluciones seriadas que se sembraron sobre placas de medio selectivo. Para determinar las frecuencias de transferencia se realizaron recuentos de los receptores, transconjugantes y donadores. En paralelo, utilizando cultivos puros de donadores o receptores, se determinó también la frecuencia de aparición de resistentes a los antibióticos de selección. En todos los casos las frecuencias de conjugación se calcularon como el número de transconjugantes dividido por el número total de células receptoras.

4.2. Conjugaciones triparentales.

La transferencia de plásmidos no autotransmisibles *E. coli* a *Rhizobium*, se realizó según el modelo de conjugación tripartito, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979). La metodología que se siguió fue similar a la de los cruces biparentales, pero en estos casos se prepararon mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones 1:1:1.

5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA.

La actividad β -glucuronidasa se determinó siguiendo la metodología modificada de la cuantificación de actividad β -Galactosidasa (Miller, 1972), según se describe a continuación:

De un cultivo bacteriano se toma 1 ml y se lava 2-3 veces con agua destilada para la eliminación de restos del medio de cultivo. Las células se resuspenden finalmente en 1 ml de tampón de ensayo, y se destinan 2x300 µl a la determinación de la actividad β-glucuronidasa y 250 µl para la cuantificación de proteínas. A cada alícuota de 300 µl se le adicionaron 640 µl de tampón de ensayo, 50 µl de SDS 0,1 % y 100 µl de cloroformo, se agitaron mediante vortex durante 15-30 segundos y se preincubaron a 37 °C durante 10 min. A continuación se añadieron 10 µl de sustrato NPG (nitrofenil-β-D-glucurónido) 100 mM precalentado a 37°C y se anotó el tiempo transcurrido hasta que apareció color amarillo patente. La reacción se detuvo por adición de 200 µl de carbonato sódico 1M seguido de centrifugación 5 min a 12.000 r.p.m. Se determinó la absorbancia de la fase acuosa en espectrofotómetro a 405 nm.

La actividad β-glucuronidasa se cuantificó según las fórmulas:

$$U_{\text{Miller}} = \frac{\text{D.O.}_{405\text{nm}} \times 1000}{t \times v \times \text{D.O.}_{600\text{nm}}}$$

Donde: t: tiempo (minutos)

v: volumen (ml)

$$R = \frac{\text{D.O.}_{405\text{nm}}/\text{min}}{c \times v \times \text{mg}}$$

Donde: R: nmol de producto formado/min/mg de proteína

v: volumen (ml)

c: coeficiente de extinción molar del NPG= 0,02

mg: cantidad de proteína, en mg

SOLUCIONES:

➤ **Tampón de ensayo**

Tampón fosfato sódico 50 mM, pH 8.

DTT 5 mM

EDTA 1mM

6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD TREHALASA EN *S. meliloti* 1021.

En todos los experimentos en los que se determinó actividad trehalasa en *S. meliloti*, se partió de 400 ml de cultivo, en MM o TY. Se dejaron cultivando a 28-30°C hasta que alcanzaron la fase de crecimiento o DO deseada en cada caso. Posteriormente, las células se lavaron al menos 3 veces en un volumen igual de una solución tampón 10 mM de Tris-HCl pH 8 o 20 mM de tampón fosfato potásico pH 6. Finalmente, se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en 5 ml del mismo tampón. Para la rotura de células de *Sinorhizobium* y la preparación de los correspondientes extractos celulares (a los que previamente se les añadió 2 µl inhibidor de proteasa AMSMF 100 mM) se utilizó una celda estándar de 40 Kpsi de una Prensa de French (ThermoSpectronic). Después de la lisis celular, los extractos fueron centrifugados y el sobrenadante fue recuperado para la determinación de actividad. Al mismo tiempo, parte de la fracción soluble también se utilizó para determinar la concentración de proteína total en cada una de las muestras utilizando el método de Bradford (1976) o el "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

Se tomaron dos alícuotas de cada muestra para cada reacción enzimática y a una de ellas se le añadió como sustrato de la reacción D(+)-Trehalose Dihydrate (SIGMA).

Las respectivas reacciones enzimáticas procedieron según los protocolos siguientes:

➤ **Actividad Trehalasa por el método de Horlacher y colaboradores (1996):**

En un tubo de 1,5 ml se adicionaron:

- 100 µl de D-trehalosa (concentración final 100 mM)
- 1 mg de proteína total (del extracto celular)
- X µl de tampón fosfato potásico 20 mM pH 6
- Volumen total final: 500 µl

A continuación, se incubó 1-2 horas a T^a ambiente y tras este tiempo se hirvió 5-10 minutos para detener la reacción enzimática. La muestra se centrifugó (12.000 r.p.m., durante 3 minutos) para eliminar la fracción no soluble y, de cada tubo se tomaron dos alícuotas de 200 µl para la cuantificación de glucosa mediante un Kit de determinación de glucosa (GO; Sigma).

➤ **Actividad Trehalasa por el método de Dardanelli y colaboradores (2000):**

En un tubo de 1,5 ml se adicionaron:

- 50 µl de trehalosa (concentración final 50 mM)
- 0,025-1 mg de proteína
- 50 µl de KCl (concentración final 100 mM)
- 50 µl de MnCl₂ (concentración final 10 mM)
- X µl de tampón PIPES pH 6 (concentración fina 50 mM)
- Volumen final: 500 µl

A continuación, se incubó 1-2 horas a 37°C y se hirvió 5-10 minutos para detener la reacción enzimática. Transcurrido ese tiempo, la muestra se centrifugó (12.000 r.p.m., durante 3 minutos) para eliminar la fracción no soluble y, de cada tubo se tomaron dos alícuotas de 200 µl para la cuantificación de glucosa mediante un Kit de determinación de glucosa (GO; Sigma).

La muestra a la que no se le añadió trehalosa como sustrato sirvió como control para establecer qué parte de la glucosa determinada se encontraba en la muestra antes de la reacción enzimática, de modo que la glucosa restante debía proceder de la acción de la trehalasa según la reacción:



Se definió 1 unidad de trehalasa como la cantidad de enzima necesaria para liberar un nmol de glucosa por minuto por mg de proteína total bajo las condiciones ensayadas.

7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TREHALOSA.

La cuantificación de trehalosa tuvo lugar según la metodología descrita por Domínguez y colaboradores (2009), mediante un método que utiliza trehalasa comercial combinada con la determinación colorimétrica de glucosa. Para ello se cultivaron las cepas a estudiar en las condiciones de interés en matraces con 20 ml de cultivo. De cada cultivo se separaron 4 alícuotas de 4 ml y se realizaron extracciones etanólicas de los precipitados celulares obtenidos, para lo cual se resuspendieron en 1 ml de etanol 75% y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se centrifugaron (14.000xg, 3 minutos) y se recuperó el sobrenadante de cada una de ellas. El proceso de extracción se repitió y el sobrenadante obtenido se desecó en un “speed-vac” (a temperatura ambiente, durante 12-16 horas). El precipitado se resuspendió en 250 µl de ácido cítrico 135 mM pH 5,7, y la fracción no soluble se eliminó tras una centrifugación (14.000xg, 3 minutos). Se calentaron las muestras a 37 °C y a tres de las réplicas se les añadió 2 µl de trehalasa comercial (4U/ml, Sigma). Las cuatro réplicas se mantuvieron a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se añadieron 250 µl de tampón Tris 500 mM pH 7,5 para detener la acción de la trehalasa. Se centrifugó de nuevo (14.000xg, 3 minutos) para eliminar los restos de la fracción no soluble y se tomaron 200 µl para determinar la glucosa procedente de la reacción utilizando un Kit de determinación de glucosa (GO, Sigma). La réplica no tratada con trehalasa permitió establecer qué parte de la glucosa determinada se encontraba en la muestra antes del tratamiento con trehalasa.

La trehalosa se cuantificó como µg del disacárido por mg de proteína total. La concentración de proteínas se determinó utilizando el “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

8. DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA/SENSIBILIDAD A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

La sensibilidad/tolerancia relativas de las distintas cepas de *S. meliloti* al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se determinó siguiendo el protocolo de Ferguson y colaboradores (2002) modificado. Para ello, se cultivaron las cepas de *S. meliloti* en medio TY líquido adicionado de los correspondientes antibióticos hasta que alcanzaron una D.O._{600nm} de 0,5. A continuación, se añadieron 50 µl del cultivo a 3 ml de TY semisólido (agar bacteriológico al 0,7%) y se tendieron sobre placas de TY sólido (1,5% agar), dejándolas solidificar durante 30 minutos. Posteriormente, se colocó en el centro de cada placa un disco de papel de 6 mm de diámetro sobre el que se añadieron 5 µl de H₂O₂. Por último, las placas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas y transcurrido ese tiempo se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

9. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO.

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron distintos métodos según el grado de pureza requerido en su uso posterior. En todos los casos, la cepa bacteriana

portadora del plásmido de interés se cultivó durante 10-16 horas en condiciones óptimas y en medios suplementados con los antibióticos correspondientes. Para la obtención de ADN plasmídico de alta pureza, para su uso posterior en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema comercial "QIAprep-spin Plasmid Kit" (QIAGEN, ref. 27104) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la comprobación de plásmidos de nueva construcción por análisis de restricción, éstos se aislaron por el método de la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello se inocularon 3 ml de medio suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en el caso de *E. coli* o a 28-30°C en el caso de *S. meliloti*, durante 12-16 h. Las células de 1,5-3 ml de cultivo se centrifugaron en tubos de microcentrifuga (12.000 r.p.m., durante 3 minutos) y se retiró el sobrenadante. Para *S. meliloti*, el sedimento se resuspendió en 200-500 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0,1% en TE pH 8, para eliminar los restos de polisacáridos. Después se centrifugaron las células (12000 r.p.m., 3 minutos), y se eliminaron los restos del sobrenadante. A continuación, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución I y las células se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionaron 200 µl de solución II, se mezcló por inversión manual del tubo entre 2-3 veces y se incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente, se añadieron 150 µl de solución III y se mezcló el tubo suavemente por inversión manual varias veces, dejándolo en hielo al menos 5 minutos. Pasado este tiempo se centrifugó (12.000 r.p.m., 3 minutos) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, al que se le añadió un volumen igual de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1). Tras mezclar bien por agitación en vórtex, se separaron las dos fases mediante centrifugación (12.000 r.p.m., 3 minutos). La fase superior acuosa, que contenía el ADN, se transfirió a un tubo nuevo, se mezcló con 2,5 volúmenes de etanol 100% preenfriado a -20°C, se incubó a -80°C durante 30 minutos y se centrifugó (12.000 r.p.m., 15 minutos). El sedimento se lavó 200-300 µl de 70% etanol (preenfriado a -20°C) y se centrifugó (12.000 r.p.m., 3 minutos). Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20-50 µl de tampón TE o H₂O.

SOLUCIONES:

- **Solución I**
 - Glucosa 50 mM
 - EDTA 10 mM
 - Tris-HCl 25 mM pH 8
 - Lisozima, 4 mg/ml
- **Solución II**

NaOH 0,2 M

SDS 1%

➤ **Solución III**

Acetato potásico 5 M (60 ml)

Ácido acético glacial (11,5 ml)

H₂O (28,5 ml) pH 4,5

➤ **Tampón TE**

Tris 10 mM

EDTA 1 mM pH 8

➤ **Mezcla fenol:cloroformo (1:1):** Mezcla 1:1 (v:v) de fenol preparado en Tris-HCl 0,1 M (pH 8), con 8-hidroxiquinoleína al 0,1%, y cloroformo:alcohol isoamílico:cloroformo (24:1).

10. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO TOTAL.

El aislamiento de ADN total se llevó a cabo mediante un método especialmente diseñado para *Rhizobium* (Estrella *et al.*, 2009). De un cultivo bacteriano en fase logarítmica de la cepa elegida, se recogieron 1,5 ml por centrifugación (12.000 r.p.m., 3 minutos). Las células se lavaron con 500 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0,1% en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). El precipitado se resuspendió en NaCl 1M y se dejó durante 1-2 horas a 4°C, agitando de vez en cuando. A continuación, se centrifugó (12.000 r.p.m., 3 minutos), se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 250 µl de una solución de sacarosa al 20% en TE (pH 8). Después se le añadieron otros 250 µl de una solución de lisozima, se mezcló por vórtex y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras la incubación, se añadieron 100 µl de una solución de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) que contenía una solución de pronasa (10mg/ml). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se incorporaron 70 µl de acetato sódico 3 M pH, 5,2, 200 µl de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1) y con 200 µl de fenol (100% fenol y 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1 M pH 8). Se agitó por vórtex durante 2-3 minutos y se centrifugó 12.000 r.p.m., 5 minutos). La fase superior se recogió en un nuevo tubo y se lavó varias veces con la mezcla de fenol:cloroformo (1:1) para eliminar impurezas. A continuación, se lavó una última vez con 300 µl de cloroformo, se agitó bien y se centrifugó durante 3 minutos a 12.000 r.p.m. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 700 µl de isopropanol (2-propanol), se mezcló suavemente y se dejó 15 minutos a -20°C. Después se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 r.p.m. y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en

100 μ l de una dilución 1/10 de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Por último, se mantuvo 30 minutos a 65°C mezclando de vez en cuando para asegurar una resuspensión completa.

SOLUCIONES:

➤ **Solución de lisozima**

RNAse 1mg/ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8)

5 mg de lisozima en 1 ml de TE (RNAse 1mg/ml).

➤ **Pronasa**

5% Sarcosil en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8)

Pronasa 10 mg/ml de 5% sarcosil en TE

Antes de añadir a la solución la muestra se precalentó a 37°C durante 5 minutos.

➤ **Mezcla fenol:cloroformo (1:1):** Mezcla 1:1 (v:v) de fenol preparado en Tris-HCl 0,1 M (pH 8), con 8-hidroxiquinoleína al 0,1%, y cloroformo:alcohol isoamílico:cloroformo (24:1).

Alternativamente para la extracción de ADN genómico total de mayor pureza se empleó el sistema Quantum Prep® AquaPure Genomic DNA kit (QUIAGEN) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN.

Se han seguido de forma alternativa dos métodos para determinar la concentración de una solución de ADN en agua o en TE de una muestra. En primer lugar, a través de Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad), un espectrofotómetro UV-visible que permite cuantificar rápidamente ADN, ARN, ácidos nucleicos marcados y proteínas con un consumo limitado (1-2 μ l) de muestra. El otro método espectrofotométrico ha sido el descrito por Sambrook y colaboradores (1989). En ambos, la concentración se determina respecto a los valores estándar de A_{260nm} de 1 para soluciones con 50 μ g/ml de ADN de cadena doble. La relación A_{260nm}/A_{280nm} se usa para estimar la pureza y calidad de la preparación, considerándose valores inferiores a 1,8 y superiores a 2,2 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 y colaboradores (1989).

12. DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

La digestión 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 los proveedores (Roche® y New England Biolabs® Inc.).

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 fenol/cloroformo (1:1). Tras mezclar bien por agitación en vórtex, se separaron las dos fases mediante centrifugación (12.000 r.p.m., 3 minutos). La fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó un 10% (v/v) de una solución de CILi 4M al sobrenadante para favorecer la precipitación del ADN, se mezcló con 2,5 volúmenes de etanol 100% preenfriado a -20°C, se incubó a -80°C durante 30 minutos y se centrifugó (12.000 r.p.m., 15 minutos). El sedimento se lavó con etanol al 70% (preenfriado a -20°C) y se centrifugó (12.000 r.p.m., 3 minutos). Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió en un volumen adecuado de agua desionizada (10-20 µl) y a continuación se llevó a cabo la digestión con la segunda enzima.

13. IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

13.1. Electroforesis de ADN.

La electroforesis de ADN se llevó a cabo según Sambrook y colaboradores (1989), utilizando geles de agarosa preparados en tampón TBE (Tris 50 mM; EDTA-Na₂ 2,5 mM; BO₃H₂ 50 mM; pH 8,2), que fue también el tampón de electroforesis. La concentración de agarosa estándar fue del 0,8%, elevándose la concentración de la misma en los casos que la presencia de fragmentos pequeños de ADN lo requería. De forma habitual se usó ADN del fago Lambda digerido con *Hind*III como patrón de pesos moleculares. El voltaje usual que se empleó fue 80 V para cubetas de electroforesis de tamaño mediano y de 60 V en cubetas de electroforesis de tamaño

pequeño. Como tampón de carga se utilizó una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua destilada.

13.2. Revelado de geles y fotografía.

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los mismos en una solución que contenía 4-5 gotas de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) en 500 ml de agua destilada, durante 10-15 minutos. Posteriormente, se visualizaron bajo luz UV (260nm) en un transiluminador.

Para la fotografía de los geles se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509) y el analizador de imágenes Quantity One de BioRad®.

13.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción.

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se efectuó teniendo en cuenta la relación logarítmica entre el tamaño molecular relativo (M_r) de las moléculas de ADN y la movilidad relativa (R_f) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores del tamaño molecular se utilizaron los fragmentos de restricción del ADN del fago Lambda resultantes de la digestión con *HindIII* (marcador II) o *EcoRI/HindIII* (marcador III).

14. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Para la purificación de fragmentos ADN se utilizaron distintos métodos según el grado de pureza requerido en su uso posterior. El primer método empleado fue el sistema comercial "QIAEX II Gel Extraction Kit" (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El segundo método empleado fue la electroelución. Tras separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, se cortó la banda de ADN de interés y se colocó dentro de un trozo de 6-7 cm de membrana de diálisis (Spectra/Por® de 16 mm de diámetro y MWCO: 12-14.000) aclarado con agua destilada y sellado por uno de sus extremos con un cierre Spectra/Por®. Se añadieron 500 µl de tampón de electroforesis TBE y se cerró la membrana por el otro extremo con un segundo cierre, procurando eliminar posibles burbujas. Este montaje se

sometió a una corriente eléctrica de 120 V durante 20 minutos, de modo que la banda de interés saliera del gel y quedase suspendida en el tampón de electroforesis. Para evitar que el ADN quedase adherido a la membrana, se sometió el montaje a una corriente (a 80 V) con la polaridad invertida durante un minuto. Tras comprobar con luz UV que no quedasen restos de ADN en el gel, se procedió a recuperar todo el tampón posible y transferirlo a un microtubo para la precipitación del ADN. Se mezcló por inversión con 50 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 ml de etanol 100%. La mezcla se mantuvo un mínimo de 30 minutos a -80°C y a continuación se centrifugó a 12.000 r.p.m durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con etanol 70% preenfriado, se secó al vacío y se resuspendió en 20 µl de solución TE pH 8.

La membrana de diálisis fue tratada antes de su utilización del siguiente modo: Se hirvió en una solución de EDTA 1mM y bicarbonato sódico al 2% durante 10 minutos, se aclaró dos veces con agua destilada y se conservó a 4°C en agua destilada adicionada con una pequeña cantidad de etanol 98% hasta el momento de su utilización.

15. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN EN VECTORES DE CLONACIÓN.

La ligación entre un fragmento de ADN y un vector de clonación adecuado se realizó empleando una relación molar de al menos 1:3 vector:inserto y una cantidad total de ADN de unos 200 ng, independientemente de que los extremos a ligar fuesen romos o cohesivos. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

En un tubo de 1,5 ml, se mezcló:

- x µl de ADN de vector*
- y µl de ADN de inserto*
- 1 µl de ligasa del fago T4 (1 unidad/ µl)
- 1-1,5 µl de tampón de ligasa (concentrado 10x)
- H₂O desionizada, (completando hasta 10 o 15 µl)
- Se mezcló suavemente e incubó a 14-16°C durante toda la noche.

16. TRANSFORMACIÓN CELULAR.

16.1. Preparación de células competentes.

La preparación de células competentes de *E. coli* se realizó según el método descrito por Lederberg y Cohen (1974).

A partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1ml/100ml de medio) y se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,3-0,6. Tras dejar enfriar en hielo durante 10 minutos, las células se centrifugaron (12.000xg, 5 minutos, 4°C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de $MgCl_2$ 0,1 M preenfriada a 4°C y se centrifugaron de nuevo (3.000xg, 5 minutos, 4°C). A continuación, las células se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución de $CaCl_2$ 0,1M preenfriada a 4°C. Tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 minutos, se centrifugaron (3.000xg, 5 minutos, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 del volumen de una solución de $CaCl_2$ 0,1 M en 20% de glicerol preenfriada a 4°C.

Las células una vez preparadas se repartieron en alícuotas de 100 o 200 μ l en tubos de 1,5 ml preenfriados a 4°C y se conservaron a -80°C hasta su uso.

16.2. Preparación de células electrocompetentes.

La preparación de células electrocompetentes de algunas de las estirpes de *E. coli*, se realizó según la técnica Hattermann y Stacey (1990). A partir de un precultivo de la cepa a transformar se inoculó un matraz de 100 ml del medio con sus antibióticos correspondientes, y se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,4-0,6. Tras dejar enfriar en hielo durante 15 minutos, las células se centrifugaron (9.829xg, 10 minutos, 4°C) y se resuspendieron sucesivamente en H_2O preenfriada, en los siguientes volúmenes: 1 vez en 1 volumen igual (100 ml), 2 veces en 0,5 volúmenes (50 ml), 1 vez en 0,02 volúmenes (2ml). Finalmente se resuspendieron en 0,003 volúmenes (0,3 ml) de glicerol al 10% (esterilizado por filtración). Las células fueron almacenadas en tubos de 1,5 ml preenfriados a 4°C en alícuotas de 50-60 μ l que se conservaron a -80°C.

16.3. 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) . Para ello, se tomaron alícuotas de 100 o 200 μ l de células competentes almacenadas a -80°C y se mantuvieron en hielo durante 10-15 minutos hasta su descongelación. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 50-100 ng de ADN plasmídico, se mezcló suavemente mediante agitación manual y se incubaron en hielo durante al menos 30 minutos. A continuación, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos a cada una de las muestras y sin excederse de este tiempo se dejaron en hielo de 2 a 5 minutos. Después, se adicionó 1ml de medio LB y las muestras se incubaron a 37°C y en agitación durante 60-90 minutos. Finalmente, se sembraron alícuotas en placas de medio LB (sólido) con los correspondientes antibióticos y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

En los casos en que los vectores permitían la selección Lac⁺/Lac⁻, a las placas de LB se añadieron 40 μ l (por cada 25 ml de medio) de una solución de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal; 20 mg/ml en dimetilformamida) y/o 4 μ l de una solución de 1-Isopropil- β -D-1-galactopiranosido (IPTG) (200 mg/ml en agua destilada).

16.4. Electroporación.

Para la electroporación de *E. coli*, a 60 μ l de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, se añadió 1 μ l (aproximadamente 20 ng) de ADN resuspendido en agua bidestilada. Esta mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm Gene Pulser[®]600 (BioRad), que se mantuvo a 4°C , evitando el contacto directo de las cubetas con el hielo. La cubeta fue sometida a un pulso eléctrico, utilizando un electroporador ELECTRO CELL MANIPULADOR[®]600 en las siguientes condiciones:

Modalidad:	T	2,5KV/Resistencia a Alto Voltaje (HV).
Capacitancia:	C	No usada en modo HV.
Resistencia:	R	R5 (129 ohm).
Carga:	S	1,3-1,5 KV.
Duración del pulso:	t	5-6 mseg.

Tras el pulso, se añadió inmediatamente 1 ml de medio LB estéril y se incubó a 37°C en agitación durante 60-90 minutos. Después de este tiempo se sembraron alícuotas de 10 a 100 µl en el medio de selección.

17. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS E HIBRIDACIÓN ("SOUTHERN BLOTTING").

17.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon.

El ADN previamente digerido y separado en gel de agarosa, se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente siguiendo el protocolo modificado de transferencia alcalina descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Para ello, los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Una vez fotografiado el gel y establecidas sus dimensiones, se procedió a su tratamiento que consistió, siempre con agitación, en un paso de 20 minutos de depurinación ácida del ADN mediante inmersión en HCl 0,25 M. Tras haber lavado el gel tres veces con agua destilada, se procedió a desnaturalizar el ADN mediante inmersión repetida en una solución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M, durante 15 minutos la primera vez y 25 minutos la segunda. Se lavó de nuevo tres veces con agua destilada y por último se neutralizó con una solución de Tris-HCl 0,5 M y NaCl 1,5 M (pH 7,4) en la que se incubó durante dos períodos de 15 minutos. Finalmente, el gel se saturó con 10xSSC y se colocó sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, cubierta con papel Whatman 3MM humedecido con 10xSSC. Sobre el gel se colocaron un filtro de nylon y dos piezas de Whatman 3MM de tamaño similar al gel (el filtro y las piezas Whatman se lavaron primero con agua destilada y se saturaron en tampón 10xSSC durante 30 minutos antes de su utilización). Sobre el dispositivo así preparado se colocaron varias piezas de papel de celulosa y, sobre éstas, un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener ligeramente comprimido el sistema.

El proceso de transferencia de ADN del gel a la membrana de nylon se realizó durante una noche. Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lavó con una solución 2xSSC para eliminar restos de agarosa, se secó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se expuso durante 30 minutos a 120°C en vacío, para fijar el ADN a la membrana o mediante 2 pulsos en UV de 0,12 J/cm².

SOLUCIONES:

➤ **SSC 10x:**

87,65 g de NaCl

4,1 g de citrato sódico

800 ml de H₂O destilada

Ajustar el pH a 7 y completar hasta 1000 ml

17.2. Marcaje no radioactivo de sondas de ADN.

El marcaje de sondas de ADN se ha realizado empleando el sistema no radioactivo de marcaje con digoxigenina comercializado por Roche[®], siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado (100°C, 10 minutos) y enfriado en hielo durante 2 minutos, además se adiciona una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTP que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante reacción inmunológica específica. La cantidad de ADN molde que se empleó fue de 100-1000 ng, en un volumen final de 20 µl, preferiblemente linearizado mediante digestión con una enzima de restricción. El tiempo de incubación fue de 20 horas y la temperatura de 37°C.

17.3. Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactivas.

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

El filtro de nylon al que se había transferido el ADN se colocó en un rodillo de hibridación al que se añadieron 20-40 ml de solución de prehibridación y se incubó a 42°C en un horno de hibridación Amersham al menos durante 2 horas. Después de eliminar la primera solución, se añadieron otros 10 ml de solución de hibridación, que consistió en solución de prehibridación suplementada con el ADN sonda desnaturalizado (95°C, 10 minutos). La membrana se incubó con la solución de hibridación a la misma temperatura (42°C) durante toda la noche. Terminado el proceso de hibridación, se procedió al revelado.

El filtro se lavó primero 2 veces con una solución 2xSSC y SDS al 0,1% (p/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente, y después otras 2 veces con una solución 0,1xSSC y SDS al 0,1% (p/v) a 68°C durante 15 minutos. Se continuó con un lavado

durante 1-5 minutos en 100 ml en tampón I a temperatura ambiente. Después, la membrana se incubó durante 30 minutos en tampón II a temperatura ambiente. Una vez lavado el filtro, se procedió a la detección inmunológica del ADN hibridado usando anticuerpos específicos antidigoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina diluídos 1:10.000 en tampón II según las indicaciones de los proveedores (Roche). A continuación se lavó (dos veces 15 minutos) con tampón de lavado, formado por tampón I + Tween 20 0,1%. La membrana se introdujo en una bolsa de plástico de tamaño ligeramente superior, y se incubó durante 5 minutos con tampón III. Tras el vaciado de la bolsa, se añadieron 10 ml de CSPD^{®#} (1:100 en tampón III) y se incubó 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y 15 minutos a 37°C. Tras eliminar el exceso de solución se selló la bolsa conteniendo la membrana de nylon. Finalmente, el ADN marcado se detectó por su capacidad de emisión de luz a una longitud de onda de 477 nm. Dicha emisión de luz se estableció poniendo en contacto el filtro con una película autorradiográfica Kodak X-Omat. El tiempo de exposición (30 minutos a 6 horas) para la detección de las bandas de hibridación depende de la cantidad de ADN, la homología entre los ADN sonda y problema y la eficiencia de la reacción de marcaje.

Para el revelado de la película se emplearon el revelador y el fijador de TETENAL[®] a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

SOLUCIONES:

➤ **Solución de prehibridación:**

SSC 5x, formamida 50%
Reactivo de bloqueo 1% (p/v)
N-lauryl-sarcosina 0,1%
SDS 0,02%

➤ **Tampón I:**

Tris-HCl 100 mM pH 7,5
NaCl 150 mM

➤ **Tampón I:**

Tampón I
Reactivo de bloqueo 1% (p/v)

➤ **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.

18. SECUENCIACIÓN DE ADN DE DOBLE CADENA.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS, por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (300-600 ng) se le adicionó el cebador específico (3,2-6,4 pmoles) y agua desionizada hasta un volumen final de 12 µl.

En la mayoría de los casos se han secuenciado las dos cadenas de ADN. Los cebadores utilizados han sido los denominados universal y reverso, correspondientes a las secuencias del fago M13 (-40) 5'GTTTTCCAGTCACGAC-3' y (-20) 5'-AACAGCTATGACCATG-3' respectivamente, presentes en los vectores de tipo pUC18, pGEMT-Easy, etc., utilizados en este trabajo.

19. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE ADN Y PROTEÍNAS.

Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), alineamientos protéicos etc., se han realizado con programas y paquetes informáticos como el programa Vector NTI™ y Clone Manager (Sci Ed Central). Los bancos de datos consultados fueron Genbank a través del servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>, la base de datos del genoma de *S. meliloti* 1021 (<http://sequence.toulouse.inra.fr/>) y la Rhizobase de KAZUSA DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>).

Los análisis de predicción de proteínas fueron realizados con los programas <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/analysis.shtml>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/> y <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>

Finalmente, el análisis filogenético de la proteína SatM (Figura 2.48) se realizó mediante la versión 4.0. del programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), utilizando 1000 réplicas “bootstrap” a través del método “Neighbor-Joining”.

20. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL.

Para el aislamiento de ARN total de *Sinorhizobium meliloti* 1021 se empleó el método modificado de extracción a través del TRI REAGENT® LS de Molecular

Research Center, Inc., y el ADN genómico residual se eliminó con RNase free DNase I de Roche®. El TRI REAGENT LS (ó Trizol) es un compuesto que combina fenol y tioguanato de guanidina en una solución monofásica para facilitar la mayor efectividad posible en la inhibición de la actividad RNAsa. Se trata de un método que sirve para extraer ARN de diversos tamaños y tipos de muestras biológicas. Para ello, las células de un cultivo se recogieron a la DO_{600nm} deseada (habitualmente 13 ml de cultivo por muestra) en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido. A continuación, se centrifugaron a 16.000xg durante 5 minutos a 4°C y después de eliminar el sobrenadante se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las células fueron almacenadas a -80°C y únicamente se sacaron (en hielo) de -80°C justo antes de comenzar el tratamiento. Después, a cada tubo se añadió 1.750 µl de la solución Tri Reagent precalentada a 70°C y se mezcló bien con la pipeta o vortex. Los tubos fueron incubados durante 10 minutos a 60°C. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron (12.000xg, 10 minutos, 4°C) y al sobrenadante que se recogió en un tubo nuevo se añadieron 0,1 volúmenes de BCP (bromocloropropano) para la separación de las fases. Después de mezclar bien (vórtex), se dejaron 2-15 minutos a temperatura ambiente y se volvieron a centrifugar (12.000xg, 15 minutos a 4°C). La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo (de 1,5, 2 o 13 ml, según el volumen de la muestra de partida) y se añadió un volumen de isopropanol. La muestra/s se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos para asegurar la precipitación y tras este período de tiempo volvieron a centrifugarse (12.000xg, 10 minutos a 4°C). Después de eliminar el sobrenadante se lavaron con etanol 70% en H₂O DEPC (agua tratada con Dietilpirocarbonato, para inhibir RNAsas o cualquier enzima capaz de degradar el ARN) y se procedió a una nueva centrifugación (12.000xg, 5 minutos a 4°C). Tras eliminar el sobrenadante y dejar los tubos abiertos para su secado a temperatura ambiente (o 30-37°C durante 10-15 minutos), el precipitado se resuspendió en 30-50 µl de H₂O DEPC (calentándolo a 50-60°C durante 5-15 minutos en los casos que fuera necesario). Finalmente, las muestras fueron directamente almacenadas a -80°C o tratadas con DNasa.

20.1. Eliminación del ADN contaminante en preparaciones de ARN. Tratamiento con DNasa I.

Era importante que todas las soluciones empleadas para el tratamiento estuviesen preparadas en H₂O DEPC o H₂O libre de RNAsa. Para ello, se preparó la siguiente mezcla de reacción que se incubó durante 1 hora a 37°C:

	<u>Concentración final</u>
ARN.....x (como máximo 92,5 µl).....	5 µg / µl
Tris.Cl 2M pH7,5.....2,5 µl.....	50 mM
MgCl ₂ 1 M.....1 µl	10 mM
DTT 0,1 M.....1 µl.....	1 mM
Inhibidor de RNAsa (40U/ µl).....2 µl.....	0,8 U/ µl
DNAsa I (10 U/ µl).....1 µl.....	1 U/ µl
H ₂ O DEPC.....92-x µl	

Volumen final	100 µl

Transcurrido el tiempo de incubación, se aumentó el volumen hasta 400 µl (+ 300 µl) con H₂O DEPC y a continuación se añadió 1 volumen igual (400 µl) de fenol. Después de mezclar (vortex durante 30 segundos), se centrifugó a 16000xg durante 10 minutos a 4°C. Este paso se repitió al menos una vez. Posteriormente, para eliminar el fenol residual, se añadió a la muestra un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se volvió a repetir el paso anterior. Después de centrifugar y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 4,8- DEPC y 2 volúmenes de etanol 100%. Tras dejar la muestra 30 minutos a -80°C y centrifugar (16.000xg) a 4°C durante 15 minutos, ésta se lavó con 1 ml de etanol 70 %-DEPC. Después de centrifugar (16.000xg, 4°C, 5 minutos) se procedió a secar la muestra a temperatura ambiente (o 30-37°C durante 10-15 minutos). Finalmente, la muestra de ARN fue resuspendida en 50-100 µl de H₂O DEPC y después de cuantificar la concentración de ARN se almacenó a -80°C.

21. SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE UNA MUESTRA DE ARN. REACCIÓN DE REVERSOTRANSCRIPCIÓN DEL ARN.

La síntesis de la hebra complementaria de ADN (cDNA o ADNc) a partir de las muestras de ARN se realizó a través de la reacción llevada a cabo por la reversotranscriptasa de Invitrogen SuperScript™ II (RT). El protocolo se desarrolló siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) de manera que la temperatura óptima de la reacción enzimática fue 42°C y los oligonucleótidos o cebadores utilizados fueron una mezcla de hexámeros “aleatorios” de Roche®.

Para la obtención del cDNA se partió de 1 a 3 µg de ARN para un volumen final de reacción de 20 µl y se mezclaron los siguientes componentes en un tubo de 1,5 ml:

	<u>Concentración final</u>
ARN total (hasta 5 µg).....	x µl
“Random primers” 100 ng / µl.....	1 µl5ng / µl
Mezcla de dNTPs 10 mM c/u.....	1 µl0,5 mM
H ₂ O DEPC o destilada (hasta 12 µl).....	x µl

Posteriormente, la mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos y se transfirió a un baño de hielo rápidamente. Transcurrido ese tiempo se adicionaron los siguientes componentes:

Tampón 5x.....	4 µl
Tampón DTT 0,1 M.....	2 µl
Inhibidor de RNAsa (40 U / µl).....	1 µl

Se mezclaron cuidadosamente para dejarlos durante 2 minutos a 25°C. A continuación, se añadió 1 µl (200 U) de enzima SuperScript II (RT) y la reacción se incubó a 42°C durante 50 minutos. Finalmente, la muestra se calentó a 70°C durante 15 minutos para detener la reacción de reversotranscripción.

22. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA. PCR CUANTITATIVA.

La amplificación de los fragmentos de cDNA para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero se realizó utilizando Platinum[®] Taq ADN polimerasa de Invitrogen. Esta enzima es una polimerasa recombinante que lleva un anticuerpo unido a su centro activo. Este anticuerpo bloquea el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que éste se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador iQ de BIORAD y en un volumen final de 25 µl que contenía: ADN (genómico o cDNA), cebadores u oligonucleótidos específicos para cada gen (0,2 µM), mezcla de dNTPs (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mM), solución de SYBR Green I[#] 0,1x y Platinum Taq ADN polimerasa (1-2,5 U). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron 35 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 45 seg; 55°C, 45 seg; 72°C, 30 seg, y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos. La

temperatura de hibridación varió en función de los cebadores utilizados. A continuación se llevaron a cabo dos ciclos de 1 minuto cada uno a 95°C y 70°C y después de la reacción se realizó un análisis de la “Curva de Melting” o curva de fusión para la determinación de la formación de productos inespecíficos.

SYBR-Green I es de Molecular Probes®.

22.1. Preparación del SYBR-Green I para PCR cuantitativa.

El SYBR-Green I es el fluorocromo más empleado en la PCR cuantitativa. Este se intercala con gran afinidad al ADN bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces, de manera que la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto de la PCR. Para su preparación se partió de una solución concentrada de SYBR-Green I (10.000x) y se diluyó 20 veces añadiendo los siguientes componentes:

DMSO.....	18 µl
SYBR-Green I (10.000x).....	1 µl
Fluoresceína* (Bio-Rad).....	1 µl
Volumen final	-----
	20 µl

A continuación, la solución diluida se almacenó en oscuridad a 4°C. En el momento de la preparación de la reacción, se procedió a hacer una dilución 1:500 en H₂O desionizada y se añadieron 0,1 volúmenes (2,5 µl por reacción) a las mezclas de amplificación justo antes de su introducción en el termociclador.

* Permite una mayor sensibilidad y efectividad en la calibración del termociclador.

22.2. Cuantificación de la expresión génica relativa.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es un método que permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. Está basada en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. Esto permite la visualización en directo del perfil completo de amplificación de los genes diana dentro de un amplio rango de magnitud. El análisis de la curva de fusión del producto posibilita además la caracterización del fragmento amplificado por su temperatura de fusión (T_m). El número de copias del ADN molde al inicio de la reacción se puede

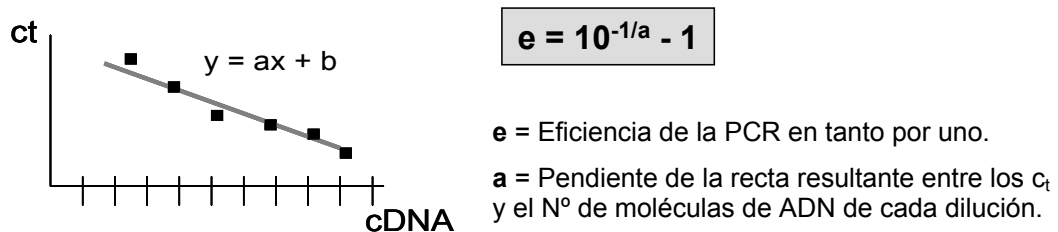
cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (ct). El ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

Para llevar a cabo el análisis de la expresión relativa de los genes de interés, fue necesario previamente calcular la eficiencia de la PCR con cada pareja de oligonucleótidos específicos de cada gen.

22.2.1. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE UNA PCR.

El método que se empleó fue el recomendado por el fabricante del termociclador a través del programa “iCycler iQ5” de BioRad que está basado en el método de Pfaffl y colaboradores (2001).

La eficiencia de una reacción de PCR en tiempo real puede calcularse a partir de la regresión lineal del c_t (ciclo umbral) frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADN. En el caso de que esta cantidad inicial sea desconocida, puede hacerse la regresión frente a una serie de diluciones de una muestra determinada. De esta manera y a través de una serie de cálculos se llega a la siguiente fórmula de eficiencia (**e**):



El cálculo de la eficiencia (**e**) para cada par de oligonucleótidos es una de las consideraciones que se deben tener en cuenta para saber si el protocolo de PCR cuantitativa ha funcionado correctamente en el caso de no obtener señal después de la amplificación. Ya que si tenemos una buena “e” después de la reacción y no observamos producto amplificado, no podemos decir que se deba exclusivamente al mal diseño de los cebadores.

Se determinó la “e” de amplificación para cada par de oligonucleótidos utilizados en cada experimento a partir de ADN genómico y una serie de diluciones del mismo y fue el programa “iCycler Q5” el que dio una eficiencia para cada par de cebadores. Se estableció como buena aquella comprendida (en %) entre **90** y **100**.

Para obtener esta eficiencia se hizo hincapié en un buen diseño de los oligonucleotidos, procurando que todos ellos tuvieran propiedades similares, es decir, que tuvieran entre 18 y 24 nucleótidos de longitud, una temperatura de fusión (T_m) similar (50-65°C), contenido en GC entre 50 y 60 % y, sobretodo que no hubiera interacciones estables (formación de dímeros, estructuras secundarias etc) entre ambos cebadores especialmente en los extremos 3'.

22.2.2. CÁLCULO DE LAS EXPRESIONES RELATIVAS.

El cálculo de expresión relativa a partir de los datos de PCR en tiempo real se hizo mediante el método delta-delta ($\Delta\Delta$) de Pfaffl (2001). Después de la reversotranscripción se amplificaron por PCR cuantitativa los genes de estudio (E) y el gen de referencia o constitutivo (C). A partir de los c_t de cada uno, el método delta-delta consistió en aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión Relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Los datos de PCR del apartado 1 del capítulo 2 (Tabla 2.2) corresponden al resultado de al menos dos réplicas técnicas de dos réplicas biológicas independientes. A continuación, se muestra un ejemplo de cuantificación de la expresión de dos genes que se han estudiado en este trabajo.

Entre los genes seleccionados para la verificación del estudio transcriptómico de *S. meliloti* 1021 (Domínguez-Ferreras *et al.* 2006) estuvieron el gen SMb20537 y el SMc02163. La expresión de ambos genes se estudió a los 60 minutos tras la adición de 400 mM de NaCl en medio mínimo (MM) y a una D.O._{600nm} de 0,4. Las células para el aislamiento del ARN y posterior RT-PCR se prepararon en dos matraces; por un lado un matraz o muestra sólo con MM y por otro, un matraz o muestra con el MM adicionado de 400 mM de NaCl. Después de llevar a cabo los protocolos de los apartados 19, 20, 21 y 22 se procedió al análisis completo de la expresión de los genes. A partir de los c_t de cada muestra, el método de Pfaffl para el cálculo de la expresión por PCR cuantitativa se aplicó según la tabla M.4.

En estas amplificaciones el gen SMb20537 se induce 16,56 veces mientras que el gen SMc02163 se reprime unas 4 (1/0,233) veces en MM a los 60 minutos después de un choque con 400 mM de NaCl, en relación al cultivo en MM.

Tabla M.4. Determinación de la expresión relativa de los genes SMb20537 y SMc02163.

Genes	Muestra	C_t	C_t	$^1\Delta C_t$	$\Delta C_t(\text{NaCl})-$	^2ER
		gen C	gen E		$\Delta C_t(\text{MM})$	
SMb20537	MM	9,95	23,55	-13,6	0	1
	NaCl	10,5	20,05	-9,55	4,05	16,56
SMc02163	MM	16,75	22,65	-5,9	0	1
	NaCl	17	25	-8	-2,1	0,233

MM; muestra de células de medio mínimo sin NaCl añadido.

NaCl; muestra de células de MM a las que se le ha adicionado 400 mM de NaCl.

Gen C; gen constitutivo ARNr 16s.

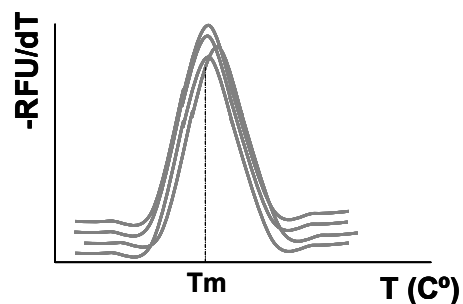
Gen E; genes de estudio, SMb20537 y SMc02163.

$^1\Delta C_t$; diferencia entre los valores de C_t gen C - C_t gen E.

^2ER ; Expresión Relativa: $2^{[\Delta C_t(\text{NaCl}) - \Delta C_t(\text{MMI})]}$

22.3. Determinación de productos inespecíficos y estructuras secundarias después de la PCR. Análisis de la curva de fusión o “curva de melting”.

Otro resultado que habitualmente se analizó después de cada reacción de amplificación fue la curva de fusión o “curva de melting”. Esta curva la proporciona el programa del termociclador y se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de temperatura del producto amplificado. Esta curva viene representada por la derivada de la fluorescencia y la temperatura. La derivada revela un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto. Cuando se utiliza el SYBR-Green I se puede confirmar la amplificación del molde específico a través de este análisis, ya que cuando se obtienen varios productos se detectan varios picos o valores de T_m .



22.4. Oligonucleótidos utilizados para PCR cuantitativa.

Tomando las pautas descritas en el apartado 22.2.1 para el diseño de los oligonucleótidos, las secuencias de los mismos para la amplificación y cuantificación de cada uno de los genes se muestran en la siguiente tabla.

Tabla M.5. Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR cuantitativa.

Nombre del Oligo	Tamaño(pb)	(5´ - 3´)
otsA(PCRq)f	18	CAGTCTCTATGCCGATTG
otsA(PCRq)r	18	ACCATTTGATCCCTCTCG
ino1(RT-PCR)f	20	ACGTGCTCGTCTCCTATCTT
ino1(RT-PCR)r	20	ATTGAGCTGGTAGGTCCGAT
rpoE5(RT-PCR)f	20	TCGCACGCAGTACAAGATTC
rpoE5(RT-PCR)r	21	CCTTATAGCTCATTCCGAACC
Smb20345(PCRq)f	18	GACGATGAGGACGATGAT
Smb20345(PCRq)r	18	ATGGCAAAGGGCTTCAAC
Smb20346(PCRq)f	18	TTACCTGGTTCTTCGCCT
Smb20346(PCRq)r	18	AAGCCTGGTGACATTCTC
Smb20347(PCRq)f	18	CCACGACGACCATTTTCAT
Smb20347(PCRq)r	18	GCCAACATCTATCGCTTC
SMb20537(RT-PCR)f	18	ACACCGTCGAAGCGTAAT
SMb20537(RT-PCR)r	18	TCCTCAAGGTCGCAAATG
Smb20651(PCRq)f	18	ATGAAAGCCGAAATCCGC
Smb20651(PCRq)r	18	AAGGTCAAGGGCATTCTGT
Smb21406-F	18	AGGAAGATCAGGTCAAGG
Smb21406-R	18	CGGTGTCAGATAATAGGG
Smb21407(RT-PCR)f	18	TCAACCGCAAGTCCAACA
Smb21407(RT-PCR)r	18	AAGGTAGTGAGGCTTCTC
Smb21448-F	18	AACGACGATTGCCTCTCT
Smb21448-R	18	TGGTGAGATAGCATTCCG
mots (PCRq)f	18	ACGGGATGAATGCGGAAA
mots (PCRq)r	18	TTGCGAGAGGCTGTTGAT
IltreS(RT)f	18	GGAAGACATTTCGAGAGGA
IltreS(RT)r	18	GGAAGACAGAAGCAGACT
SMb20968(RT-PCR)f	18	AGCGTAAAGGAGACATCG
SMb20968(RT-PCR)r	18	CGGGTGAGAACGTGAAAT
rRNA 16S(PCRq)f	18	TCTACGGAATAACGCAGG
rRNA 16S(PCRq)r	18	GTGTCTCAGTCCCAATGT
pgi (RT-PCR)f	18	AATGACATCGGTTCCCTG

pgi (RT-PCR)r	18	CGGCTTCTACAATCGCAA
S Mb21044(RT-PCR)f	18	TGGATGTGCCTTACGAGT
S Mb21044(RT_PCR)r	18	AAAGCCGAAACCGACTAC
S Mb20522(RT-PCR)f	18	GGCATACTCGGTATTGGA
S Mb20522(RT-PCR)r	18	CTGCTCCTTGGTGATGTT
S Mc00885(RT-PCR)f	18	CATCGCTGGCATTGTAGA
S Mc00885(RT-PCR)r	18	ACCTGAAACCCAGACCAT
S mb20094(PCRq)f	18	ATAATCACCTCCTGCTCG
S mb20094(PCRq)r	18	ACCAGTATTTTCGCATCGG

23. ENSAYOS CON PLANTAS.

23.1. Esterilización de semillas y germinación.

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L. variedad Aragón) se sumergieron en HgCl₂ al 2,5% durante 9,5 minutos en agitación. A continuación, se lavaron 5 veces con agua destilada estéril en condiciones axénicas y se dejaron en imbibición durante una hora y media como mínimo. Después, se lavaron 2 veces más con agua destilada estéril y se repartieron en placas que contenían un papel de filtro humedecido con 3 ml de agua destilada estéril. Finalmente, se dejaron a 28°C en oscuridad durante 24 horas.

23.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas.

Para el cultivo de plantas se utilizó la solución de Rigaud y Puppo (1975) modificada:

Macroelementos:	KH ₂ PO ₄	68 mg/l
	K ₂ HPO ₄	44 mg/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	123 mg/l
	K ₂ SO ₄	174 mg/l
	CaSO ₄	173 mg/l
	EDTA férrico (secuestreno).....	25 mg/l

Microelementos:	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0,11 mg/l
	H ₃ BO ₃	2,85 mg/l
	MnSO ₄ .4H ₂ O.....	3,07 mg/l
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,55 mg/l
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2 mg/l

23.3. Cultivo axénico de plantas.

El cultivo axénico de plantas de alfalfa se llevó a cabo según la técnica descrita por Olivares y colaboradores (1980). Cuando las plántulas de alfalfa recién germinadas alcanzaron aproximadamente 1 cm de longitud, se colocaron individualmente en tubos de 20 x 200 mm que contenían 10 ml de solución nutritiva sin nitrógeno y un soporte de papel de filtro. Se dejaron los tubos en oscuridad durante 2-3 días. A continuación, para evitar la incidencia directa de la luz sobre las raíces, la parte inferior de los tubos se cubrió con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas en las siguientes condiciones: 150 $\mu\text{einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($\lambda = 400\text{-}700\text{ nm}$) de intensidad lumínica, fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 23/17°C de temperatura día/noche y 50% de humedad relativa.

Transcurridos 7-10 días en la cámara, se inoculó cada tubo con 1 ml de una suspensión celular de aproximadamente $10^6\text{-}10^7$ ufc/ml de la cepa de estudio.

23.4. Medida del grado de infectividad.

Con cada una de las cepas de estudio se inocularon de 16 a 24 tubos preparados como se describe en el apartado anterior. Tras la inoculación se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados por cada planta. El seguimiento de la nodulación se continuó hasta las 4-5 semanas después de la inoculación.

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

Capítulo 1. MANIPULACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TREHALOSA POR *Sinorhizobium meliloti*: EFECTOS SOBRE LA OSMOTOLERANCIA Y LA SIMBIOSIS CON ALFALFA.

ANTECEDENTES.

Las secuencias genómicas de diversos rizobios confirman que es común la existencia de varias rutas para la biosíntesis de trehalosa en estas bacterias (p.e. al menos 3 rutas distintas en *Sinorhizobium meliloti*). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio permitieron caracterizar a nivel genético la biosíntesis de trehalosa en 2 especies distintas de rizobios, *S. meliloti* (simbionte de *Medicago* spp.) y *Mesorhizobium loti* (simbionte de *Lotus* spp.). Fue posible construir cepas carentes de cada una o de varias de estas rutas biosintéticas simultáneamente, indicando que en *S. meliloti* la ruta TPS/TPP (*otsAB*) era la más crítica para la síntesis de trehalosa en condiciones de estrés, siguiéndole en importancia la ruta TreY/TreZ, mientras que TreS podría ser de importancia sólo bajo condiciones muy específicas (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009b). Por su parte, *M. loti* MAFF303099 parece poseer sólo la ruta TPS/TPP. En ambas especies la transcripción de los distintos genes biosintéticos se elevó en condiciones de estrés osmótico, aunque se ha evidenciado que probablemente exista también una regulación postranscripcional. Las cepas carentes de todas las rutas biosintéticas tenían muy disminuidos sus niveles de trehalosa tanto en condiciones de estrés como en situaciones no estresantes. La incapacidad para sintetizar trehalosa se correlacionó en ambas especies de rizobios con una importante reducción de la tolerancia a estrés osmótico y posiblemente a otros estreses abióticos en vida libre. Más interesante aún es que en ambas especies bacterianas la biosíntesis de trehalosa fue necesaria para una óptima infectividad y efectividad simbióticas, incluso en condiciones no estresantes (Domínguez-Ferreras, 2007; Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009b).

Estos resultados fueron concordantes con otros trabajos en los que se ha observado una implicación de la biosíntesis y acumulación de trehalosa intracelular con la eficiencia simbiótica (caso de *R. etli*; Suárez *et al.*, 2008) o una reducción de la capacidad competitiva (caso de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; McIntyre *et al.*, 2007). A pesar de la escasez de trabajos hasta el momento, los datos existentes sugieren que la síntesis de trehalosa por la bacteria es importante para el óptimo desempeño de la simbiosis tanto en condiciones estresantes como no estresantes.

Con objeto de profundizar más en la posible importancia del metabolismo de la trehalosa para las propiedades simbióticas y de adaptación a diversos estreses abióticos en *S. meliloti*, se propuso estudiar el efecto de una posible sobreacumulación de trehalosa sobre las propiedades bacterianas, tanto en vida libre como en simbiosis. Para ello, se manipuló dicha acumulación de trehalosa mediante 1) reducción de su catabolismo y 2) aumento de su síntesis por parte de la bacteria.

1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD TREHALASA EN *S. meliloti* 1021.

La trehalosa puede ser utilizada como fuente de carbono y energía por muchos organismos, para lo cual necesitan una actividad enzimática específica, la trehalasa, presente en plantas, animales y hongos, que hidroliza la trehalosa para formar dos moléculas de glucosa. Las bacterias suelen utilizar una enzima diferente para degradar la trehalosa, generalmente la trehalosa fosforilasa, aunque también pueden disponer de trehalasas citoplasmáticas o periplásmicas (Argüelles, 2000). Como se ha señalado anteriormente, este azúcar no es muy abundante en plantas vasculares (excepto en las llamadas plantas resurrección), aunque sí existe actividad trehalasa en distintos tejidos y órganos de diversas especies vegetales. Pero a diferencia del resto de tejidos vegetales, los nódulos de leguminosas son abundantes en trehalosa y presentan una alta actividad trehalasa.

A pesar de que es conocida la capacidad de síntesis y acumulación de trehalosa en *Rhizobium*, se ha descrito comparativamente muy poco sobre la actividad trehalasa en este grupo bacteriano (Salminen y Streeter, 1986; Dardanelli *et al.*, 2000). En primer lugar, con objeto de optimizar las condiciones para la determinación de actividad trehalasa en *S. meliloti* 1021, se emplearon dos protocolos diferentes. Estos métodos fueron descritos por Horlacher y colaboradores (1996), y Dardanelli y colaboradores (2000), respectivamente. Se partió de dos extractos celulares de *S. meliloti* 1021, obtenidos a partir de células cultivadas en medio mínimo (MM) y recogidas en fase estacionaria de crecimiento, a una DO de 1,8-2. El primero de ellos fue resuspendido en un tampón Tris-HCl pH 8, según el método de Dardanelli (2000) y el segundo en un tampón fosfato potásico pH 6, según el método de Horlacher (1996). La descripción de estos protocolos se encuentra en el apartado 6 de Materiales y Métodos.

Simultáneamente, se determinó actividad trehalasa, según el método de Horlacher (1996) en la cepa DH5 α de *E. coli*. Aunque los datos de actividad en esta especie bacteriana no se muestran en este trabajo, fueron esenciales para utilizarlos

como referencia en el experimento. Para ello, se prepararon dos cultivos en medio MMA, de tal modo que a uno de ellos se le aplicó un choque salino hasta alcanzar una concentración de 400 mM de NaCl y las células se recogieron 5-6 horas después. El otro cultivo en cambio, se dejó incubando hasta que alcanzó una DO de 2, momento en que fueron recogidas las células.

En la figura 1.1 se muestran los resultados de actividad trehalasa de *S. meliloti* 1021 empleando los dos métodos anteriormente citados. Se define una unidad de trehalasa como la cantidad de enzima necesaria para liberar un nmol de glucosa por hora por mg de proteína total en las condiciones ensayadas.

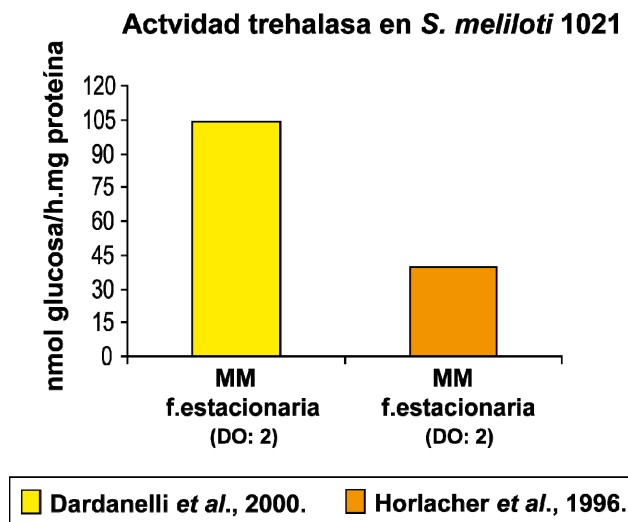


Figura 1.1. Actividad trehalasa en *S. meliloti* 1021 utilizando los protocolos de Horlacher (1996) y Dardanelli (2000).

Se pudo observar que dependiendo del método empleado, la actividad en *S. meliloti* 1021 podía variar significativamente (Figura 1.1). La actividad enzimática fue 2,6 veces inferior utilizando el protocolo de Horlacher que el de Dardanelli. Este último pareció ser el más apropiado para determinar actividad trehalasa en *S. meliloti*, alcanzándose los 100 nmoles de glucosa/h.mg proteína durante la fase estacionaria de crecimiento en condiciones normales. Es muy probable que las distintas temperaturas y pH aplicadas en los dos métodos ensayados, fueran el motivo de las diferencias de actividad observadas.

2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN SMB20968 DE *S. meliloti* 1021.

En la anotación del genoma de *S. meliloti* 1021 no existe ninguna referencia a una posible trehalasa. No obstante, un análisis de este genoma nos permitió identificar el gen SMB20968, que codifica para una proteína con similitud de secuencia a trehalasas bacterianas, y que además posee dominios funcionales típicos de trehalasas y otras glucosil hidrolasas.

2.1. ANÁLISIS “in silico” DEL GEN SMB20968 DE *S. meliloti*.

El gen SMB20968 localizado en el plásmido pSymb de *S. meliloti* 1021 codifica para una proteína de 570 aminoácidos con dominio glicosil hidrolasa y posible actividad α,α -trehalasa (EC.2.1.28), que presenta identidades (38-54 %) con proteínas de bacterias de los géneros *Pseudovibrio*, *Oceanicola*, *Paenibacillus*, y *Geobacillus*. Las únicas proteínas de rizobios con las que muestra alguna similitud son proteínas de *R. leguminosarum*, *M. loti* y *B. japonicum* (Tabla 1.1) con las que comparte el 34, 26 y 25% de identidad de secuencia, respectivamente. Además, en el plásmido pSymb de *S. meliloti* existe otra proteína de 734 aminoácidos codificada por el gen SMB20116, que tiene un 24% de identidad con SMB20968. Todas las proteínas se encuentran muy conservadas en estas especies bacterianas, pero al igual que en *S. meliloti* poseen funciones desconocidas.

Tabla 1.1. Identidad de secuencia de SMB20968 de *S. meliloti* 1021 con otras proteínas bacterianas.

Organismo	Anotación del gen	Tamaño (aa) [#]	Identidad
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	SMB20968	570	100 %
<i>Pseudovibrio</i> sp JEO62	GDB1	570	54 %
<i>Oceanicola granulosis</i>	HTCC2516	562	54 %
<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	Pjdr2DRAFT_1189	568	38 %
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC10	GYMC10DRAFT_2375	568	39 %
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	pRL120266	422	34 %
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll0692	660	26 %
<i>B. japonicum</i> USDA110	Blr2754	734	25 %
<i>S. meliloti</i> 1021	SMB20116	734	24 %

[#] Número de residuos aminoacídicos (aa) de la correspondiente proteína.

Por otro lado, si se observa la región génica en la que se encuentra el gen SMb20968, se puede apreciar que forma un operón junto con 5 genes más. Aguas abajo de SMb20968, se halla el gen SMb20967 que codifica para un posible represor transcripcional de 344 aminoácidos. Mientras que los genes que se encuentran aguas arriba, SMb20969, SMb20970, SMb20971 y SMb20972, codifican para proteínas que formarían parte de un sistema de transporte de azúcares de tipo ABC (Figura 1.2). Una región génica que parece localizarse y conservarse también en las bacterias *Pseudovibrio*, *Oceanicola*, *Paenibacillus* y *Geobacillus*.

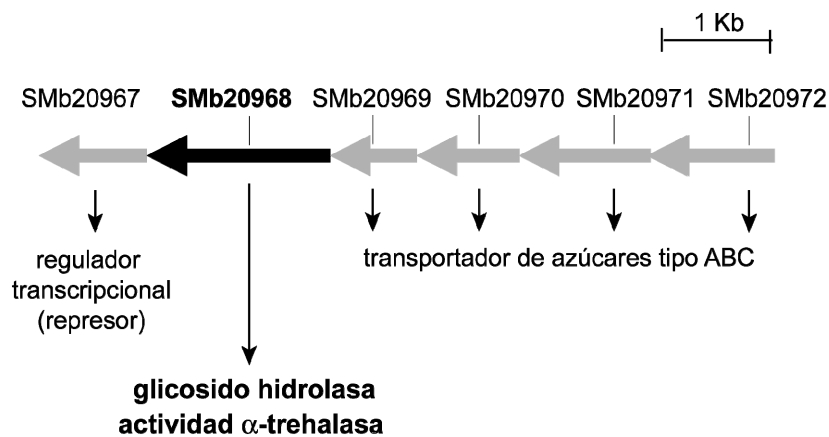


Figura 1.2. Representación de la región génica de SMb20968 de *S. meliloti* 1021. En la parte superior se muestra la organización de los genes y en la parte inferior la hipotética actividad de los correspondientes productos protéicos.

Se determinó también el perfil de hidrofobicidad de la proteína SMb20968 mediante el método Kyte-Doolittle (1982). Según este perfil, el producto del gen SMb20968 carece de un dominio de aminoácidos hidrofóbicos lo suficientemente importante como para que esta proteína estuviese integrada en la membrana citoplasmática. Además, programas de predicción de lipoproteínas y otras proteínas de secreción señalaron que carece de péptido señal, descartando así la posibilidad de que pueda estar localizada en el periplasma. Por tanto, es factible que esta proteína se localice en el citoplasma bacteriano.

El alineamiento del producto de SMb20968 con trehalasas de *E. coli* mostró un 14,6% y 15,3% de similitud con TreA y TreF, respectivamente. Asimismo, programas de predicción de estas proteínas mostraron que la proteína SMb20968 tenía un perfil hidrofóbico más parecido al de TreF que al perfil de las trehalasas TreC y TreA de *E. coli*. Estos datos indujeron a pensar que el gen SMb20968 podría estar codificando

para una trehalasa de tipo TreF, y que podría tener un papel relevante en el catabolismo de la trehalosa en *S. meliloti*.

Una manera de comprobar la implicación de este gen en condiciones de elevada salinidad y la importancia del mismo en la acumulación de trehalosa, es a través de la construcción y caracterización de mutantes. El modo de obtención del mutante en el gen SMb20968 está descrito en el anexo 1 de este capítulo.

2.2. CAPACIDAD DE OSMOADAPTACIÓN EN VIDA LIBRE DEL MUTANTE SMb20968 DE *S. meliloti* 1021.

En primer lugar, se llevaron a cabo curvas de crecimiento con el mutante en el gen SMb20968; 1021(SMb20968⁻), en medio rico TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo (Figura 1.3). Se hicieron también curvas de choque salino en medio mínimo, tras la adición externa de NaCl a cultivos en fase logarítmica (DO_{600nm} de 0,4) (Figura 1.4).

En todos los casos se incluyó como referencia los correspondientes cultivos de la cepa parental *S. meliloti* 1021. Las curvas de crecimiento en medio TY y MM no mostraron diferencias significativas entre la cepa mutante 1021 (SMb20968⁻) y la cepa parental 1021. Una mutación en el gen SMb20968 de *S. meliloti* no parecía haber alterado la capacidad de esta bacteria para crecer en medio líquido adicionado de altas concentraciones de sal.

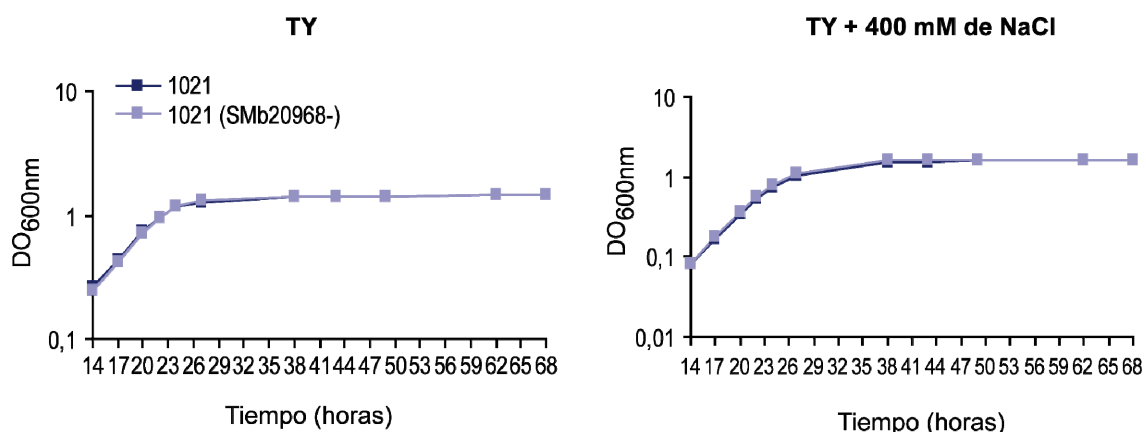


Figura 1.3. Curvas de crecimiento de un mutante SMb20968⁻ de *S. meliloti* en TY adicionado de 400 mM de NaCl (B) desde el inicio del cultivo.

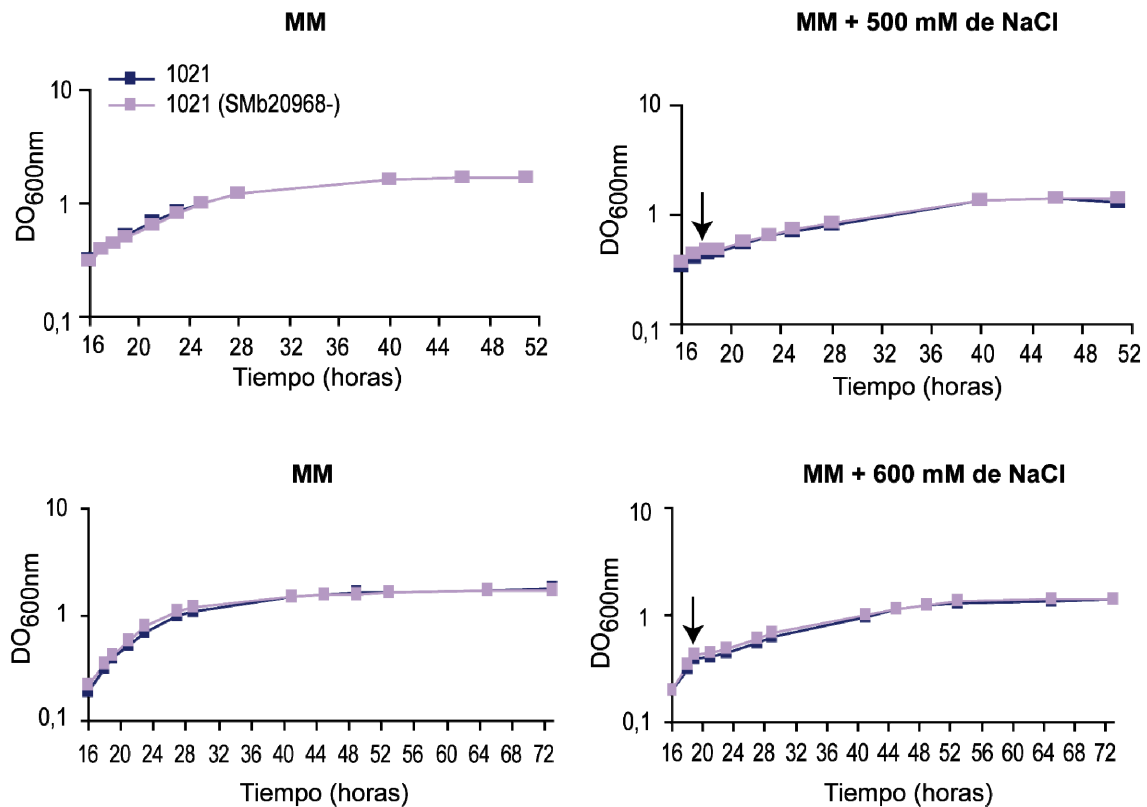


Figura 1.4. Curvas de crecimiento de un mutante en el gen SMb20968 de *S. meliloti* 1021 tras un choque salino en medio mínimo (MM). Se adicionó NaCl durante la fase logarítmica (en el punto indicado por la flecha).

Para determinar si pudieran existir diferencias de crecimiento en medio sólido, se determinó la capacidad de osmoadaptación del mutante SMb20968⁻ sobre placas de medio TY adicionado de 400 mM, 500 mM NaCl o 700 mM de sacarosa (Figura 1.5).

Los resultados obtenidos en medio sólido fueron semejantes a los obtenidos en medio líquido. Es decir, no se observaron cambios en la capacidad de crecimiento de la cepa mutante SMb20968⁻ en las tres condiciones ensayadas.

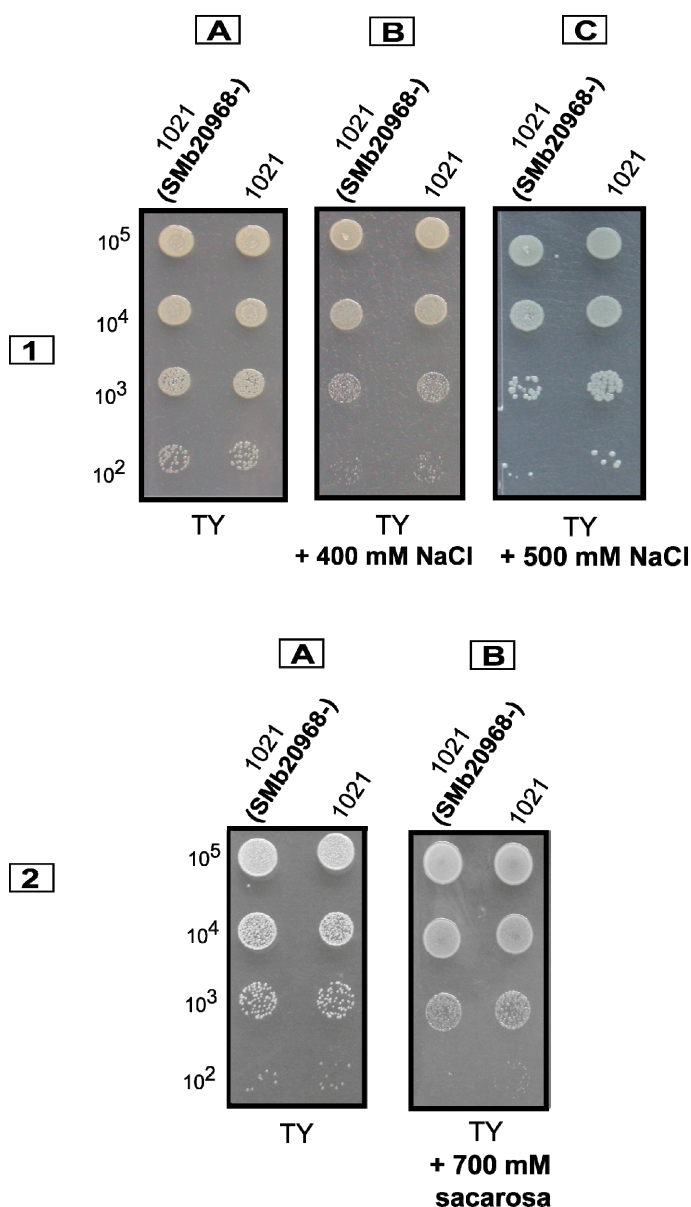


Figura 1.5. Crecimiento del mutante SMb20968⁻ de *S. meliloti* 1021 en TY sólido adicionado de 400 mM (1B) y 500 mM de NaCl (1C) y 700 mM de sacarosa (2B).

2.3. PAPEL DEL GEN SMb20968 DE *S. meliloti* 1021 EN TOLERANCIA A DIFERENTES ESTRESSES ABIOTICOS.

Como se ha podido observar en el apartado anterior, una mutación en el gen SMb20968 de *S. meliloti* no reveló ninguna alteración del crecimiento en condiciones de estrés osmótico. Para determinar si el gen SMb20968 pudiera estar implicado en la tolerancia a otros tipos de estreses, se determinó además la capacidad de crecimiento de la cepa mutante 1021 (SMb20968⁻) a una temperatura supraóptima de 37°C y a pH 6. Una manera rápida de compararlo fue a través de ensayos de gota sobre placas de

medio sólido. Para ello, se colocaron 10 μ l de diluciones seriadas de un cultivo de la cepa mutante en crecimiento exponencial (desde 10^2 hasta 10^5 ufc) sobre medio TY normal y medio TY con un pH de 6 (tamponado con MES). Un grupo de placas se incubó a 37°C durante 3 días, mientras que el resto creció a 30°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.6.

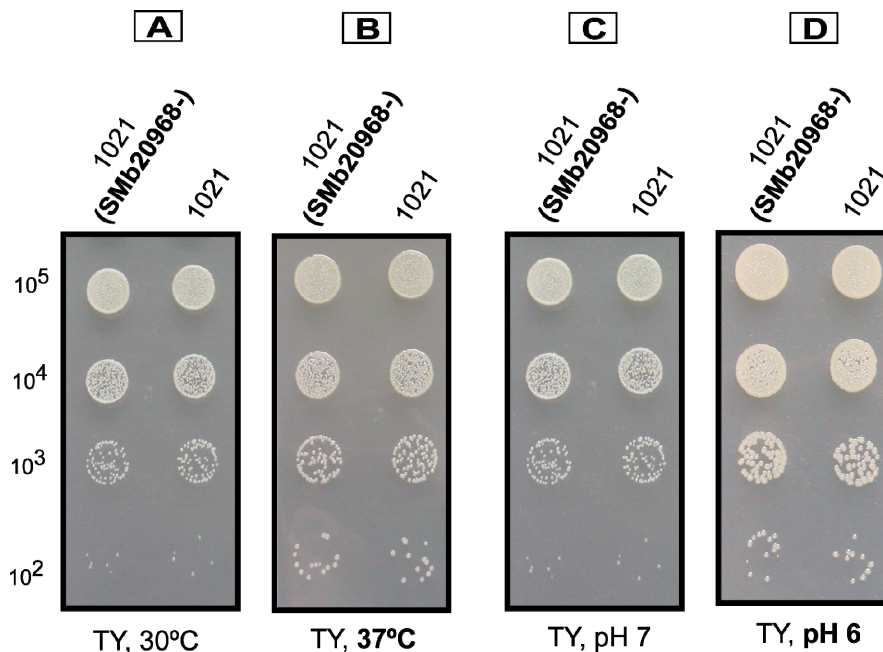


Figura 1.6. Crecimiento del mutante SMB20968 de *S. meliloti* en TY a temperatura supraóptima (B) y a pH ácido (D). Se incluye como referencia el crecimiento en TY a 30°C y pH 7 (A y C).

De nuevo, no se observaron alteraciones del crecimiento del mutante 1021 (SMB20968⁻) a 37°C y pH 6, con respecto a la cepa parental.

2.4. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DEL MUTANTE SMB20968⁻ EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO EN MEDIOS QUE CONTIENEN TREHALOSA.

Se ha descrito que la trehalosa es un osmoprotector no acumulado en *S. meliloti*, de modo que cuando está presente en concentraciones bajas en el medio de cultivo, es capaz de aliviar los efectos del estrés osmótico (Gouffi *et al.*, 1999). Para determinar si un mutante SMB20968⁻ podía estar afectado en la utilización de este azúcar, tanto en condiciones normales como en condiciones de elevada salinidad, se obtuvieron curvas de crecimiento en medio mínimo líquido adicionado o no de 400 mM de NaCl y en presencia o ausencia de 5mM de trehalosa. Además, se determinó el

crecimiento en un MM en el que el manitol fue sustituido por trehalosa como única fuente de carbono, a una concentración de 50 mM (1,7% p/v).

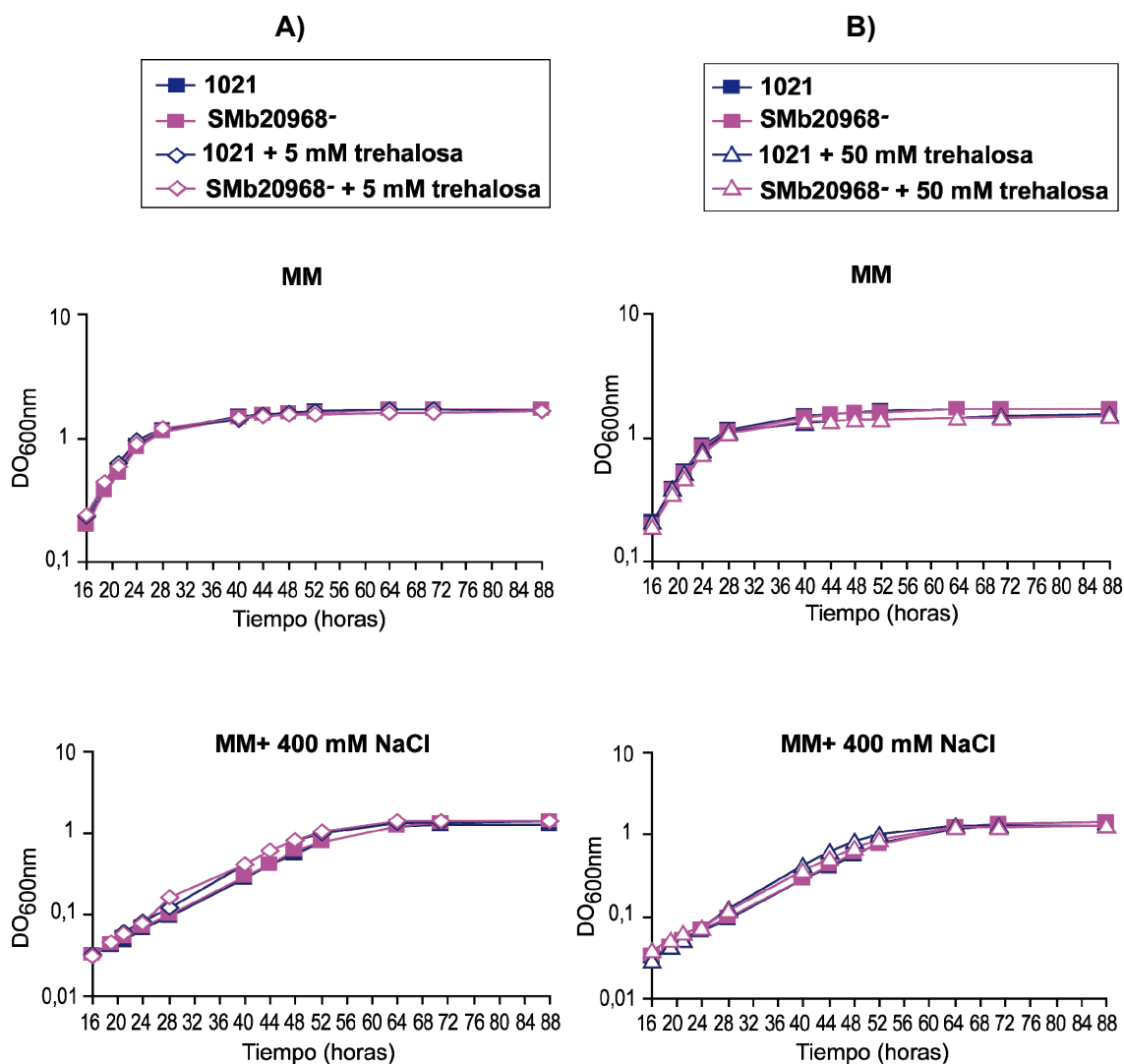


Figura 1.7. Curvas de crecimiento de un mutante SMb20968⁻ de *S. meliloti* 1021 en MM adicionado de 5 mM (A) o 50 mM de trehalosa (B) en presencia o ausencia de 400 mM de NaCl.

Las curvas de crecimiento (Figura 1.7) no mostraron diferencias significativas entre la cepa mutante (SMb20968⁻) y la cepa parental 1021 en ninguna de las condiciones ensayadas.

Puesto que el medio mínimo empleado para las curvas de crecimiento contenía glutamato y este compuesto es considerado un eficiente osmoprotector que también es utilizado por muchas otras bacterias como fuente de nitrógeno y de carbono, cabía la posibilidad de que el glutamato del medio estuviese actuando como osmoprotector, tanto en presencia como en ausencia de trehalosa, enmascarando así los posibles

efectos de la mutación en SMb20968. Por ello, se estudió de nuevo el crecimiento de este mutante en las mismas condiciones pero esta vez en un medio mínimo en el que el glutamato fue sustituido por otra fuente de nitrógeno distinta, como el KNO_3 (0,6 g/l).

En la figura 1.8 se muestra el crecimiento del mutante SMb20968 en medio mínimo sólido adicionado o no de 400 mM de NaCl y en presencia o ausencia de trehalosa.

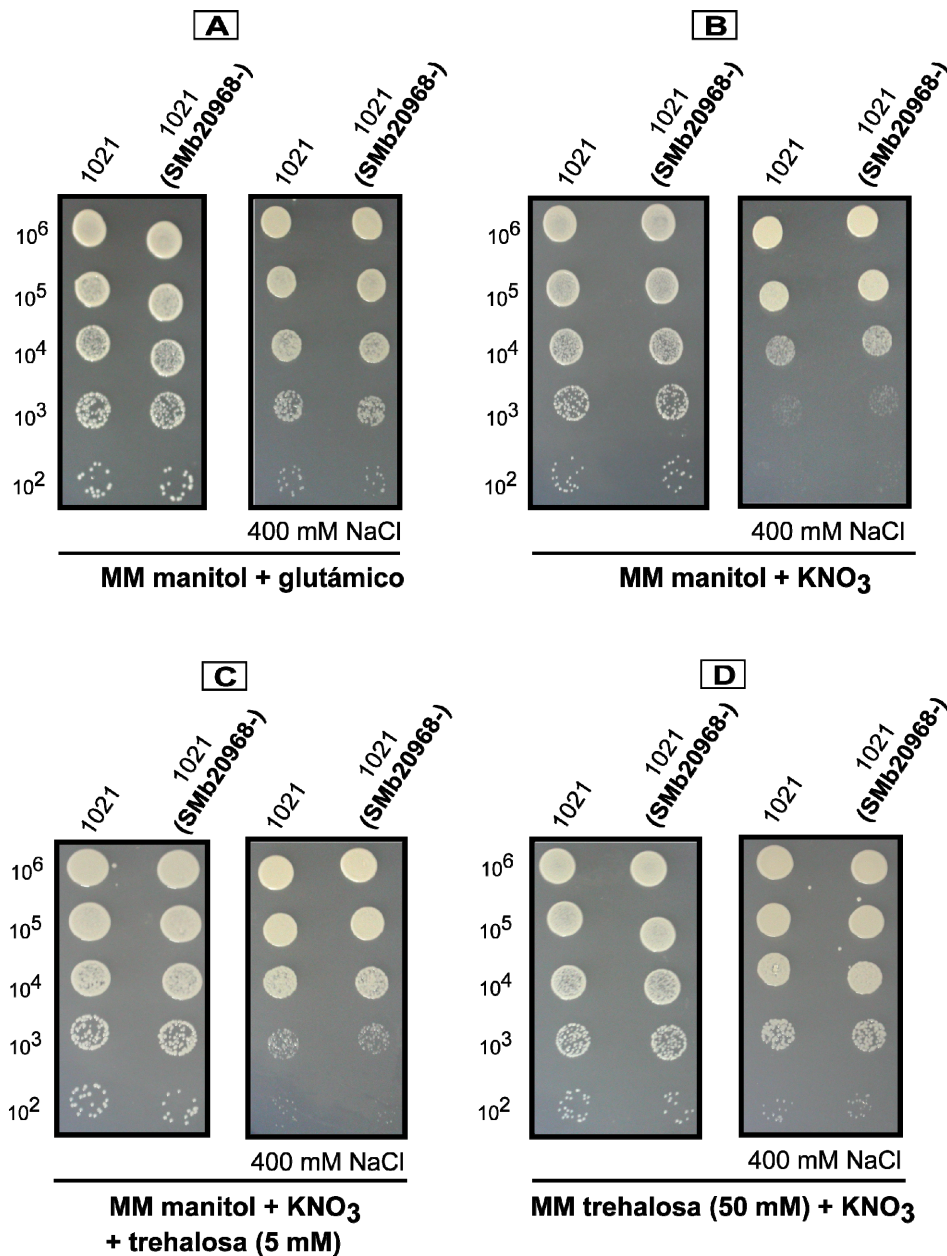


Figura 1.8. Crecimiento del mutante SMb20968⁻ de *S. melloti* en medio mínimo sólido en condiciones de estrés salino en presencia de trehalosa en el medio (C) y como única fuente de carbono (D). Se incluye como referencia el crecimiento en MM con manitol como fuente de carbono y ácido glutámico o KNO_3 como fuentes de nitrógeno (A y B).

2.5. CAPACIDAD DE OSMOADAPTACIÓN EN VIDA LIBRE DE LA CEPA 1021 DE *S. meliloti* QUE SOBREEEXPRESA EL GEN SMb20968.

Con objeto de tener mayor información acerca de esta posible trehalasa en el metabolismo de *S. meliloti*, se llevaron a cabo estudios de sobreexpresión del gen SMb20968. Una mayor actividad trehalasa como consecuencia de la sobreexpresión del gen SMb20968 podría conllevar una menor acumulación de trehalosa por la bacteria y afectar por tanto a su tolerancia a estrés.

La construcción de un plásmido (pJBtreF) que sobreexpresa el gen SMb20968 en *S. meliloti* 1021 se describe en el anexo 2.3 de este capítulo.

Una vez obtenida la cepa 1021(pJBtreF) de *S. meliloti* que sobreexpresa el gen SMb20968, se realizaron curvas de crecimiento en MM adicionado de 400 mM de NaCl (Figura 1.9) y curvas de choque salino en MM mediante la adición de 500mM y 600 mM de NaCl (Figura 1.10) a cultivos en fase exponencial de crecimiento. Al mismo tiempo, se estudió el crecimiento sobre placas de MM sólido adicionado de 400 mM de NaCl (Figura 1.11). Todos los ensayos se hicieron del mismo modo que los realizados para la cepa mutante 1021(SMb20968⁻). En algunos casos, además de incluir como referencia la cepa parental 1021, se introdujo también 1021(pJB3Tc19), portadora del vector de clonación vacío.

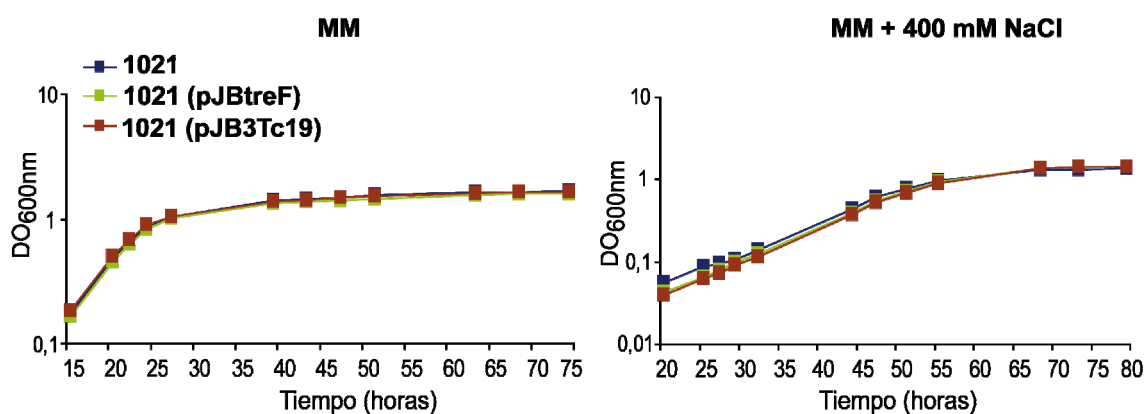


Figura 1.9. Curvas de crecimiento de la cepa 1021(pJBtreF) en medio mínimo adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo.

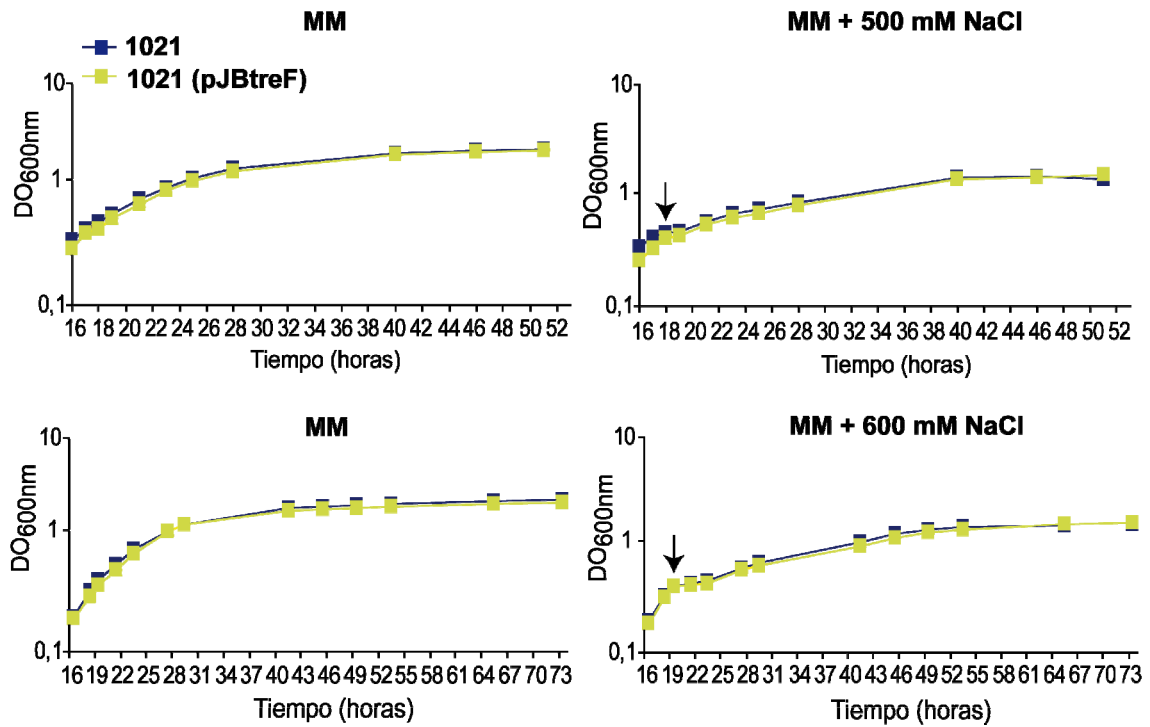


Figura 1.10. Curvas de crecimiento de la cepa 1021(pJBtreF) tras un choque salino en medio mínimo (MM). Se adicionó NaCl durante la fase logarítmica (en el punto indicado por la flecha).

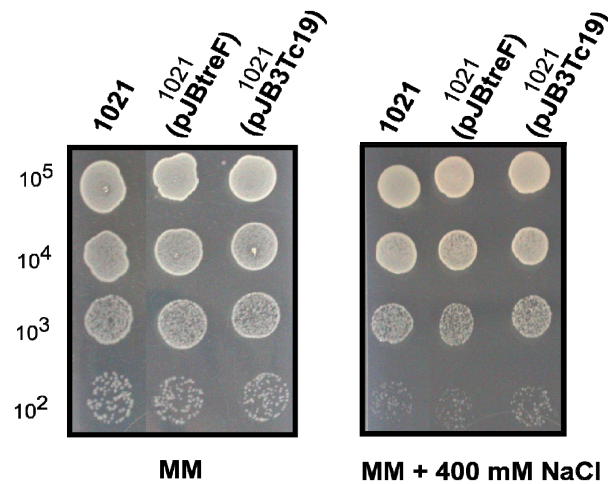


Figura 1.11. Crecimiento de la cepa de *S. meliloti* 1021 que sobreexpresa el gen SMb20968 en MM adicionado de 400 mM de NaCl.

Como puede observarse en las figuras I.9, I.10 y I.11, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre la cepa parental y la cepa que sobreexpresa el gen SMb20968.

2.6. ACUMULACIÓN DE TREHALOSA EN LA CEPA DE *S. meliloti* 1021 QUE SOBREEXPRESA EL GEN SMb20968.

A pesar de no haber observado diferencias significativas en tolerancia a estrés salino en la cepa 1021 (pJBtreF) con respecto a su parental, se decidió estudiar la acumulación de trehalosa en ambas cepas durante el crecimiento en condiciones de estrés.

Estudios anteriores en nuestro laboratorio pudieron demostrar que *S. meliloti* 1021 acumulaba trehalosa dependiendo de la fase de crecimiento. Se observó un fuerte incremento de la cantidad de trehalosa acumulada en la fase estacionaria tardía en condiciones no estresantes. Además, se determinó trehalosa en cultivos de *S. meliloti* 1021 sometidos a choque osmótico por distintas concentraciones de NaCl, observándose que los mayores niveles de trehalosa acumulada por las células ocurrían 25-30 horas después de la adición de 300 mM de NaCl (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estos resultados, se determinó el contenido de trehalosa intracelular en la cepa 1021(pJBtreF) en idénticas condiciones. Para ello, se dejaron crecer los cultivos hasta una DO_{600nm} de 0,4, momento en el que se adicionó NaCl hasta alcanzar una concentración de 300 mM. La trehalosa acumulada se determinó 25 horas después del choque salino.

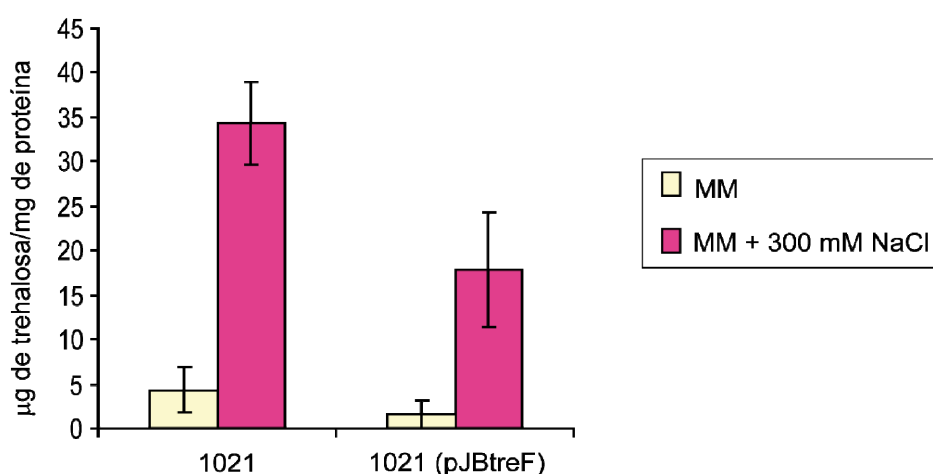


Figura 1.12. Trehalosa acumulada en la cepa que sobreexpresa el gen SMb20968 de *S. meliloti* 1021 tras un choque salino con 300 mM de NaCl. Se incluye como referencia la determinación de trehalosa en la cepa parental 1021. Cada dato es la media de y 2 experimentos independientes. Las barras de error asociadas representan el error estándar.

Los datos de la figura 1.12 muestran que, concordante con Domínguez-Ferreras y colaboradores (2009), la cantidad de trehalosa acumulada por *S. meliloti* aumentó significativamente en respuesta a un choque osmótico. La adición de 300 mM de NaCl al medio también provocó un aumento de los niveles intracelulares de trehalosa en la cepa 1021(pJBtreF) con respecto a las condiciones control, pero los niveles de trehalosa acumulados fueron significativamente inferiores que los de la cepa parental.

2.7. PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN SMb20968 DE *S. meliloti* 1021.

Se estudió la expresión del gen SMb20968 de *S. meliloti* en respuesta a un choque salino. La determinación de los cambios en la expresión génica se realizó por la técnica de RT-PCR en tiempo real y la cuantificación tuvo lugar a las 1, 4, 8 y 12 horas tras la adición de 400 mM de NaCl al medio (MM) cuando el cultivo estaba en fase exponencial de crecimiento (a una DO_{600nm} de 0,4) de *S. meliloti* 1021. La expresión se normalizó con la del gen 16s ARNr (SMc03224) de *S. meliloti*, que fue el gen de referencia utilizado. Los resultados se representan en la figura 1.13 y corresponden a la media de dos réplicas biológicas independientes y dos réplicas técnicas.

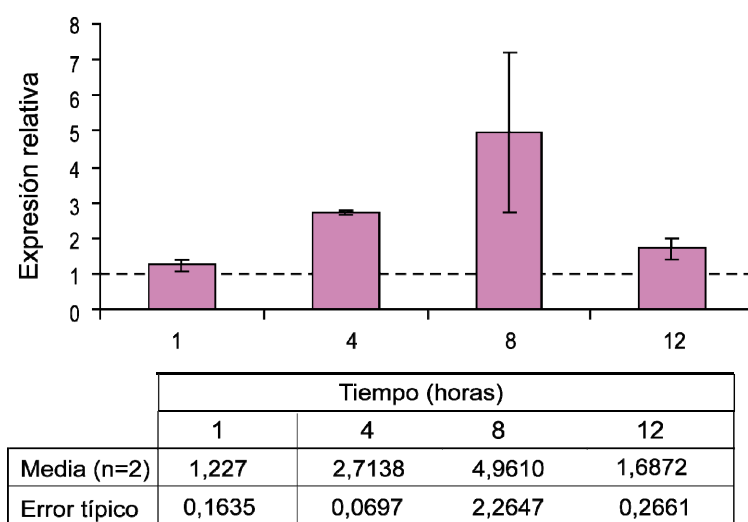


Figura 1.13. Expresión del gen SMb20968 a lo largo de la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021 tras la adición de 400 mM de NaCl en MM. Cada dato es la media de al menos 2 réplicas biológicas y las barras asociadas representan el error estándar.

Se observó que a los 60 minutos tras el choque, la expresión no variaba significativamente con respecto a las condiciones control. Los niveles de expresión comenzaron a aumentar a partir de ese momento, con un incremento significativo de los niveles de transcritos de SMb20968 en condiciones de elevada salinidad, alcanzando el máximo nivel de expresión a las 8 horas después del choque. La expresión disminuyó a las 12 horas tras la adición de NaCl, momento que coincidía con la entrada en fase estacionaria.

2.8. ACTIVIDAD TREHALASA EN *S. meliloti* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.

De acuerdo a los resultados previos, se determinó actividad trehalasa en células cultivadas en condiciones de elevada salinidad, a distintos tiempos (4, 8, 12 y 24 horas) tras la aplicación de un choque salino (400 mM NaCl) en medio mínimo (MM), tanto en la cepa parental 1021 como en el mutante para el gen SMb20968. Todos los ensayos se realizaron en paralelo con células de *S. meliloti* en MM sin NaCl añadido.

El procedimiento para determinar actividad trehalasa está descrito en el apartado 6 de material y métodos, todo ello según Dardanelli y colaboradores (2000). Los datos obtenidos en estas condiciones se muestran en la figura 1.14.

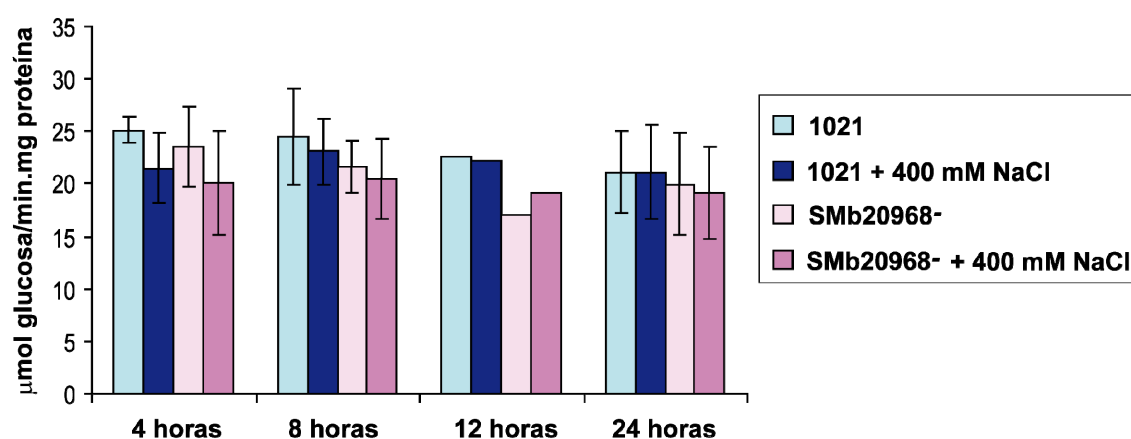


Figura 1.14. Actividad trehalasa en un mutante SMb20968⁻ de *S. meliloti* y en la cepa parental 1021 en MM a distintos tiempos tras un choque de 400 mM de NaCl. Cada uno de los datos, salvo los correspondientes a las 12 horas, es la media de dos experimentos distintos y las barras asociadas representan el error estándar.

La actividad trehalasa total en *S. meliloti* no aumentó significativamente en respuesta a un choque salino. Es más, la adición de NaCl al medio provocó una ligera disminución de la actividad en algunos casos (4 y 8 horas), si bien las diferencias no fueron significativas. Un comportamiento similar se observó para la cepa mutante SMb20968, que además mostró niveles de actividad trehalasa total similares a los de la cepa silvestre.

2.9. COMPORTAMIENTO SIMBIÓTICO DEL MUTANTE EN EL GEN SMb20968 DE *S. meliloti* 1021.

Se determinó la infectividad de un mutante SMb20968 de *S. meliloti* 1021, así como la de la cepa derivada que sobreexpresa el gen SMb20968 en raíces de alfalfa (*Medicago sativa*). Las plantas fueron inoculadas con 10^6 ufc/ml de cada una de las cepas y se estudió la cinética de nodulación con respecto a la cepa parental 1021 (Figura 1.15).

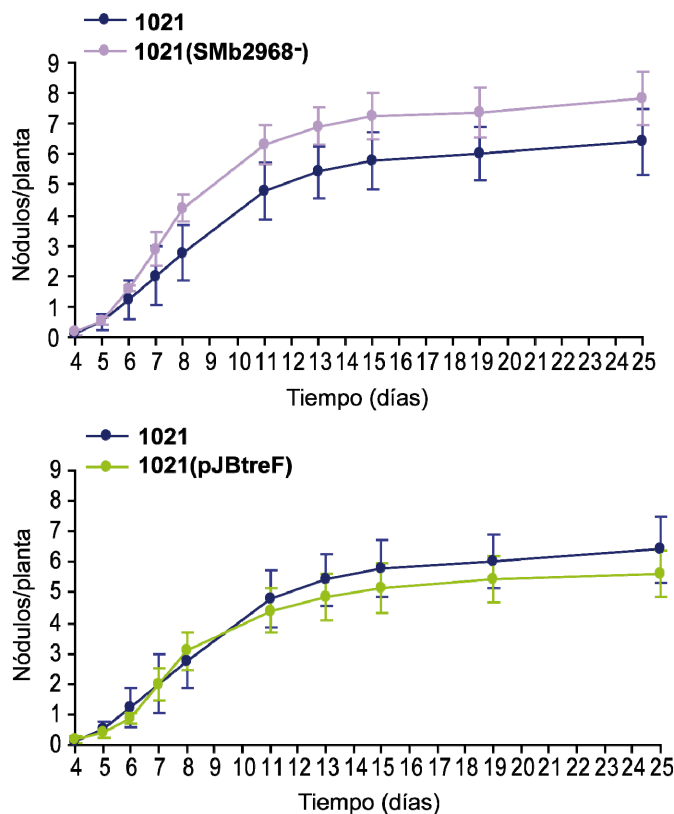


Figura 1.15. Cinéticas de nodulación del mutante SMb20968 de *S. meliloti* y de la cepa que sobreexpresa el gen SMb20968. En cada gráfica se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021. Cada punto es la media de 3 experimentos independientes (20 plantas por experimento), y las barras asociadas corresponden al error estándar.

Tras la realización de 3 experimentos de infectividad, se pudo apreciar que tanto el mutante en el gen *treF* como la cepa que sobreexpresa dicho gen fueron capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de alfalfa. Si bien la cepa mutante pareció tener una tendencia a formar mayor número de nódulos por planta que la cepa parental, estas diferencias no fueron consideradas estadísticamente significativas según un test de ANOVA a lo largo de los 25 días tras la inoculación. Por otra parte, la cepa 1021(pJBtreF) mostró una cinética de nodulación muy similar a la cepa parental.

3. AUMENTO DE LA CAPACIDAD DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA Y SU EFECTO SOBRE LA OSMOADAPTACIÓN DE LA BACTERIA.

Para determinar si el aumento de la capacidad de síntesis de trehalosa por *S. meliloti* conlleva una mejora de la tolerancia a estrés en vida libre, se llevaron a cabo estudios de sobreexpresión de genes clave en las distintas rutas de biosíntesis identificadas en *S. meliloti*, clonados en vectores plasmídicos y expresados bajo el control del promotor *P_{lac}*. Utilizando el plásmido pJB3Tc19 (Blatny *et al.*, 1997) como vector de clonación, se obtuvieron tres construcciones distintas:

- pJBotsA, que lleva clonado el gen *otsA* de *S. meliloti* 1021, que codifica para trehalosa-6P sintasa, enzima responsable de la primera etapa catalítica de la ruta TPS/TPP.
- pJBtreY, que lleva el gen *treY* de *S. meliloti* 1021, que codifica para la maltooligosil trehalosa sintasa, de la ruta TreY/TreZ.
- pJBtreS que lleva el gen *treS* de *S. meliloti* 1021, que hipotéticamente codifica para una trehalosa sintasa.

El procedimiento para la obtención de estas construcciones está descrito en el anexo 2.2 de este capítulo.

3.1. Capacidad de acumulación de trehalosa y de crecimiento en condiciones de estrés salino de cepas de *S. meliloti* 1021 que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa.

Se estudió la capacidad de crecimiento de cada una de las cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 en medio mínimo adicionado de 400 mM de NaCl, tanto en medio líquido como sólido (Figuras 1.16 y 1.17). En todos los casos se incluyó como referencia la cepa de 1021 portadora del vector pJB3Tc19.

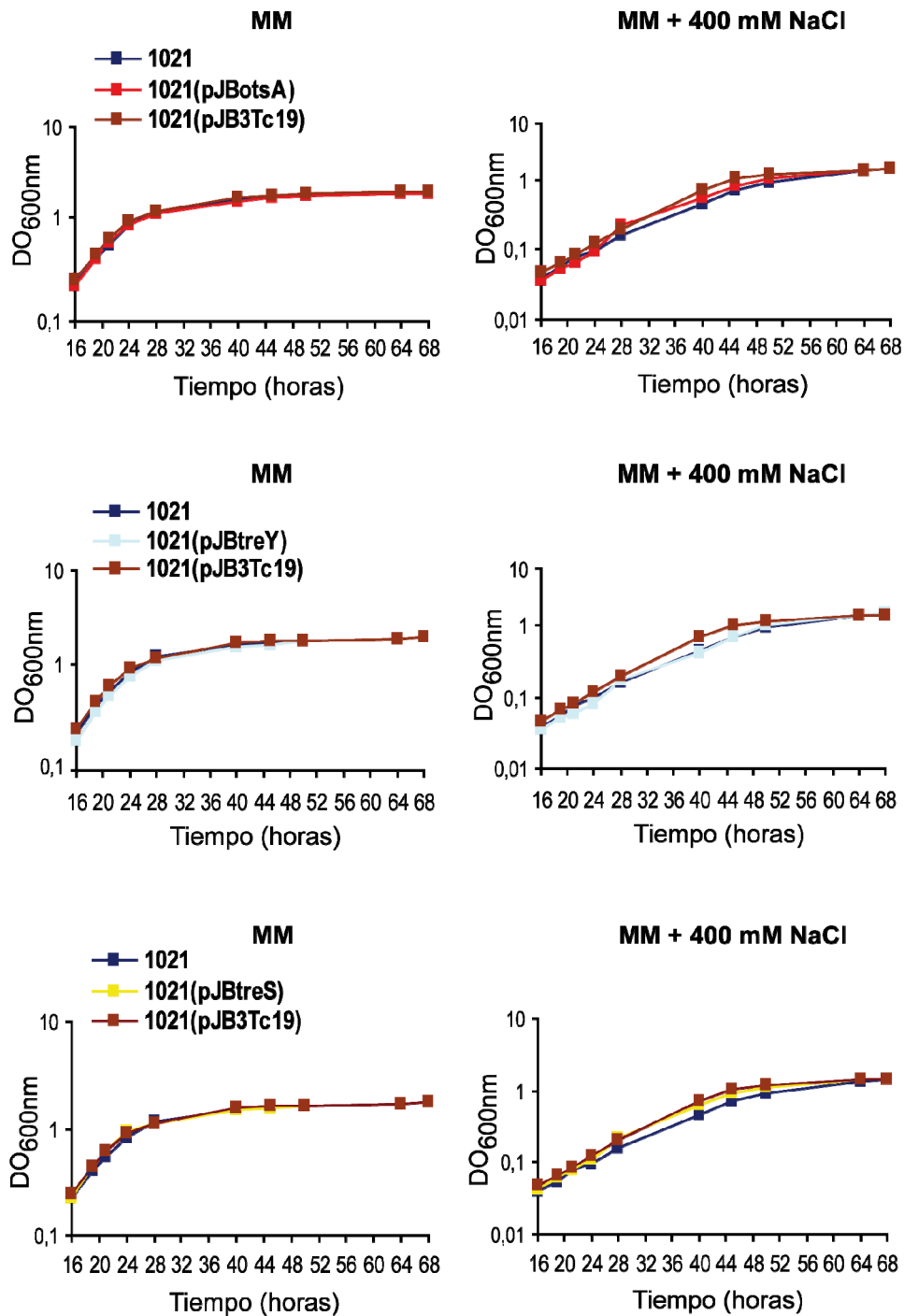


Figura 1.16. Curvas de crecimiento de cepas de *S. meliloti* que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa, en MM adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo.

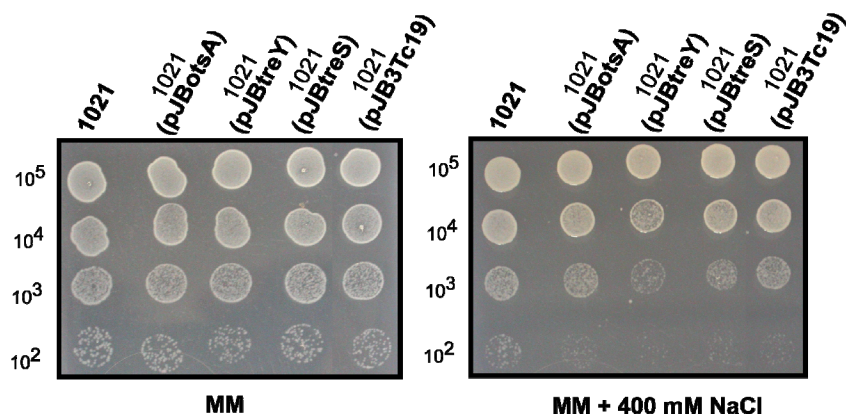


Figura 1.17. Crecimiento en MM sólido adicionado de 400 mM de NaCl de cepas de *S. meliloti* que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa.

Como se puede observar en las figuras 1.16 y 1.17, las cepas de *S. meliloti* que sobreexpresan los genes de síntesis de trehalosa mostraron una capacidad de crecimiento en MM adicionado de 400 mM de NaCl similar a la de las cepas utilizadas como control, 1021 y 1021(pJB3Tc19).

Para comprobar si estas construcciones genéticas realmente determinan un aumento de los niveles de trehalosa acumulada en condiciones de estrés, se cuantificó la acumulación de trehalosa en fase estacionaria tardía tras un choque salino en MM. Teniendo en cuenta que *S. meliloti* acumula mayores niveles de trehalosa tras la adición de 300 mM de NaCl (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009), se determinó la trehalosa acumulada 25 horas después de un choque con 300 mM de NaCl (Figura 1.18).

Por otro lado, se considera que en bacterias, la ruta TPS/TPP es generalmente la más ampliamente distribuida y la más importante para la síntesis de trehalosa en condiciones de estrés osmótico. Además, en *S. meliloti* 1021 se demostró que la ausencia de *otsA* provocaba una sensible disminución del contenido de trehalosa asociada a una reducción de la capacidad de osmoadaptación (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009). Con estos antecedentes, se decidió estudiar si la sobreexpresión de esta ruta biosintética, además de conllevar un aumento de la trehalosa acumulada en condiciones de estrés salino, conllevaba también un aumento de la tolerancia a estrés en las mismas condiciones (Figura 1.19).

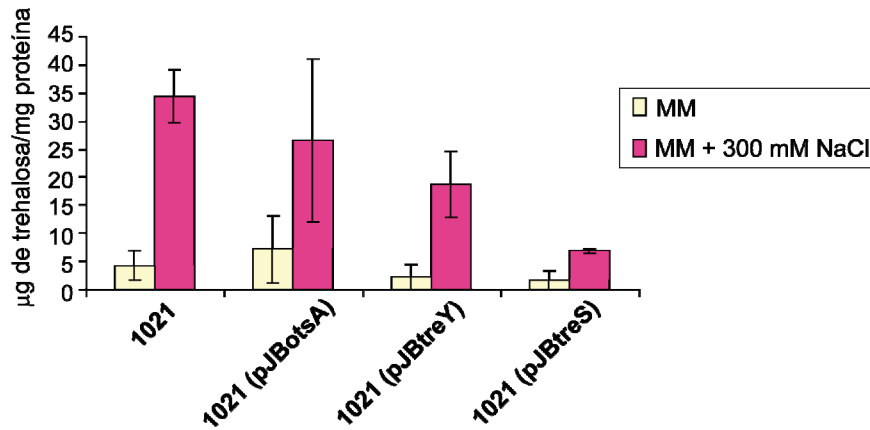


Figura 1.18. Trehalosa acumulada en respuesta a la adición de 300 mM de NaCl en MM por cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 que sobreexpresan genes de síntesis de trehalosa. Cada dato es la media de 2 experimentos y las barras asociadas representan el error estándar.

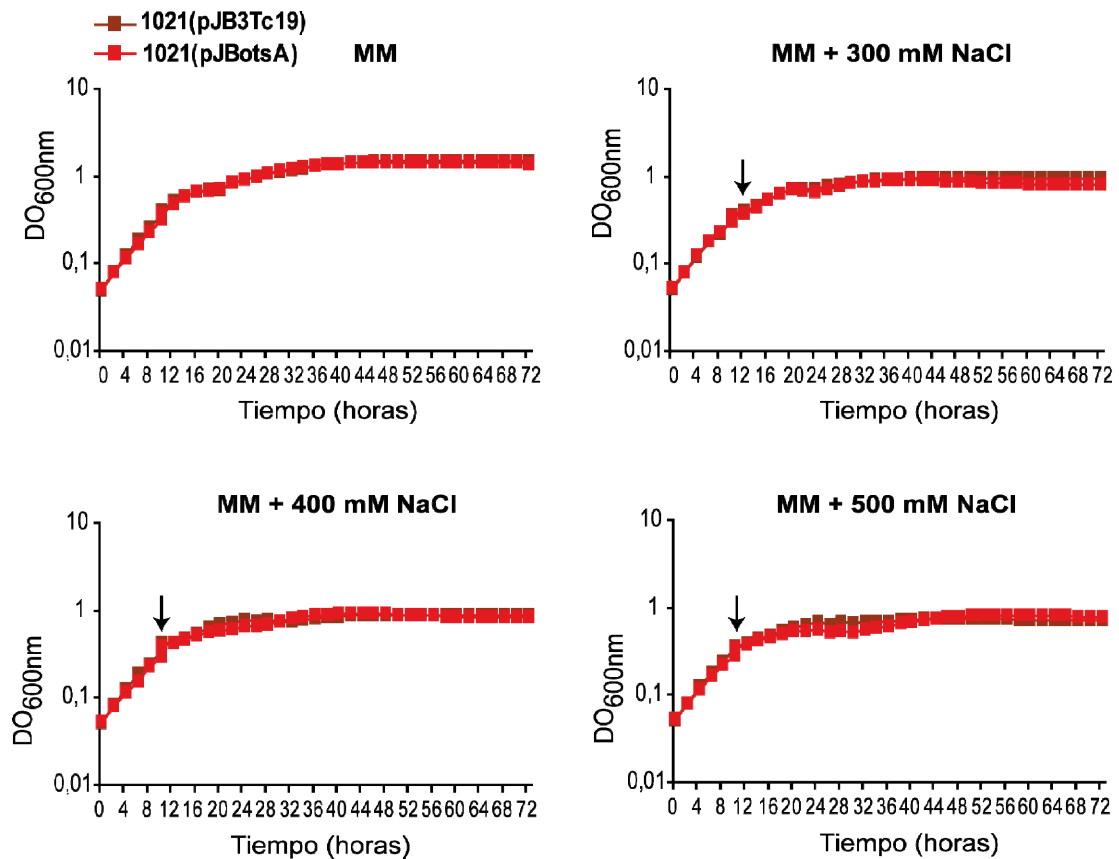


Figura 1.19. Curvas de crecimiento de la cepa 1021 (pJBotsA) tras un choque salino en MM. Se adicionó NaCl durante la fase logarítmica (en el punto indicado por la flecha).

Los resultados de la figura 1.18 muestran un aumento de la trehalosa acumulada en condiciones de estrés salino, tanto por 1021 como por las cepas de *S. meliloti* que sobreexpresan los genes de las distintas rutas de síntesis de trehalosa.

Sin embargo, los niveles de trehalosa acumulada en estas cepas no son superiores a los de la cepa parental. De nuevo, se puede observar en la figura 1.19, que la sobreexpresión de la ruta TPS/TPP en de la cepa 1021(pJBotsA) no conlleva una mejora en la capacidad de crecimiento de la bacteria tras un choque a distintas concentraciones de NaCl.

En MM mínimo los resultados obtenidos para este sistema de síntesis fueron negativos, por lo que se volvió a determinar trehalosa en medio rico TY (Figura 1.20). Para ello, se cuantificó trehalosa en la cepa 1021(pJBotsA) a las 25 horas después de un choque salino con 400 mM de NaCl.

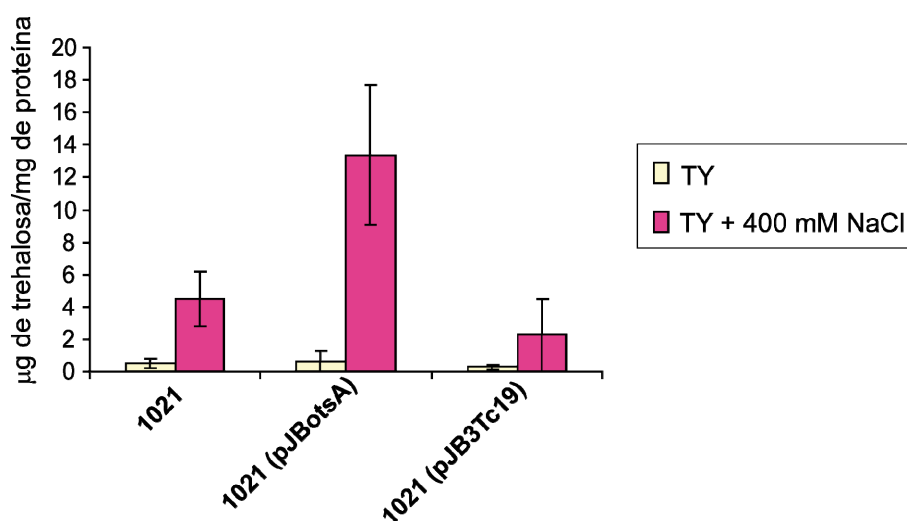


Figura 1.20. Trehalosa acumulada en las cepas de *S. meliloti* 1021 que sobreexpresan el gen *otsA* de la ruta de síntesis de trehalosa en respuesta a un choque salino con 400 mM de NaCl en medio TY. Se incluyen como referencia la cepa parental y la cepa portadora del vector vacío. Cada dato es la media de 4 réplicas y las barras asociadas representan el error estándar.

Como se puede observar en la figura 1.19, la sobreexpresión del gen *otsA* en TY adicionado de 400 mM de NaCl provocó un significativo aumento de los niveles de trehalosa acumulada. Estos resultados contrastaron con los obtenidos en MM (Figura 1.18). Para comprobar si un aumento en la cantidad de trehalosa acumulada por la sobreexpresión de esta ruta biosintética podía estar asociado a una mejora de la tolerancia bacteriana a estrés, se estudió a continuación la capacidad de crecimiento de la cepa 1021(pJBotsA) en TY sólido adicionado de 400 mM de NaCl (Figura 1.21) así como el crecimiento de la bacteria en medio TY líquido tras un choque a distintas concentraciones de NaCl (Figura 1.22).

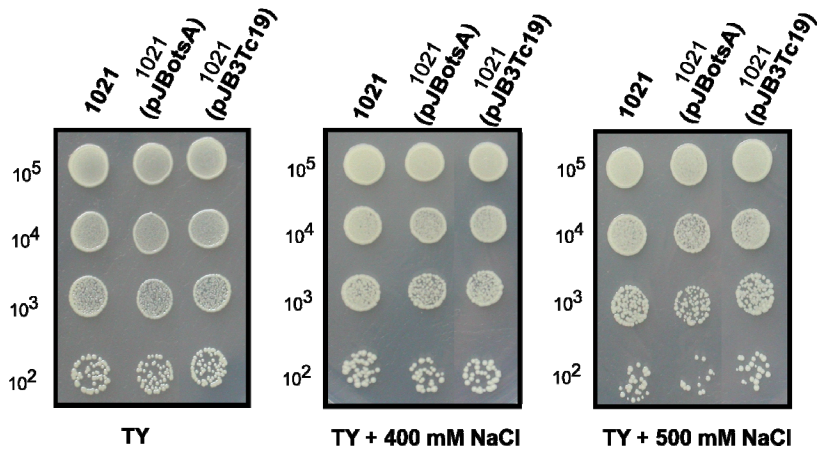


Figura 1.21. Crecimiento de la cepa 1021 (pJBotsA) en TY sólido adicionado de 400 mM de NaCl.

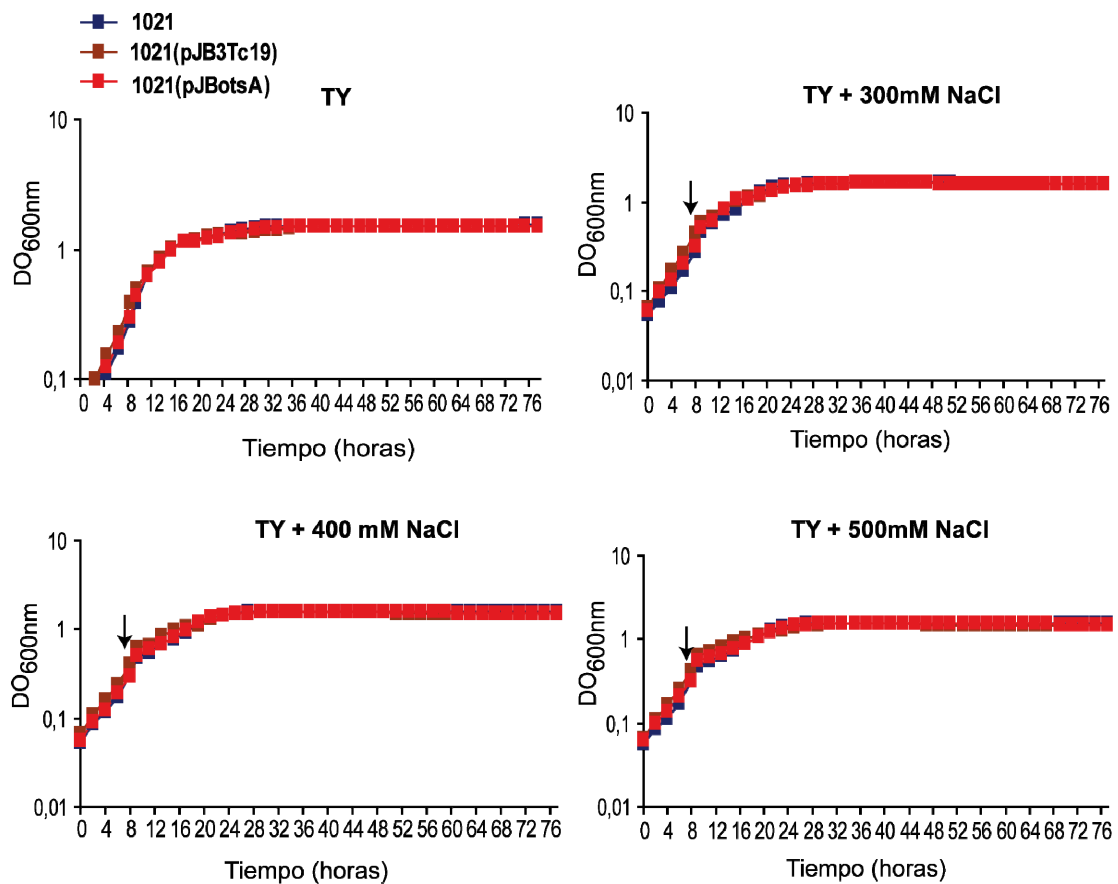


Figura1.22. Curvas de crecimiento de la cepa 1021 (pJBotsA) tras un choque salino en TY. Se adicionó NaCl durante la fase logarítmica (en el punto indicado por la flecha).

Si se observan los resultados de las figuras 1.21 y 1.22, se puede apreciar que no hubo diferencias significativas en el crecimiento de la cepa 1021(pJBotsA) con respecto a su cepa parental en medio TY adicionado de altas concentraciones de NaCl. El aumento de trehalosa acumulada por 1021(pJBotsA) no conllevaba una mejora de la tolerancia a estrés salino.

Por otro lado, se sabe que en *S. meliloti* 1021 el gen *otsA* se localiza en el pSymA (Sma0233), y hasta el momento no ha podido identificarse un gen homólogo a *otsB* (T6P fosfatasa) en el genoma de esta bacteria, gen que sí es fácilmente identificable, por homología de secuencias, en los genomas de *S. medicae* y varios otros rizobios. Es posible que en *S. meliloti* alguna otra proteína realice la función de T6P fosfatasa y sea necesaria la sobreexpresión del gen o genes que codifiquen para esta proteína. Quizás, un aumento de los niveles de trehalosa 6P por parte de la enzima TPS no sea suficiente para observar una mejora en la tolerancia de *S. meliloti* a estrés salino.

Para comprobar posibles diferencias en la sobreexpresión de uno o ambos genes de la ruta TPS/TPP, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio salino con cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099, que sobreexpresan el gen *otsA* de *S. meliloti* o el operón *otsAB* de *M. loti*.

En *M. loti* MAFF303099, ambos genes conforman un operón *otsAB* (mll0691-mll0690) localizado en el cromosoma, por lo que se amplificó la región correspondiente a ambos genes y se clonó en el plásmido pJB3Tc19, dando lugar a la construcción pJBotsA/B. Esta nueva construcción fue introducida en las cepas 1021 y MAFF303099 de *S. meliloti* y *M. loti*, y se llevaron a cabo ensayos de tolerancia en medios con elevada salinidad. Para cepas de *S. meliloti* portadoras de las construcciones pJBotsA y pJBotsA/B, se estudió la capacidad de crecimiento en medio rico TY adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl desde el inicio del cultivo (Figura 1.23). Al mismo tiempo, se realizaron curvas de crecimiento de *M. loti* en TY adicionado de 50 mM, 75 mM y 100 mM de NaCl (Figura 1.14).

Los resultados de las figuras 1.23 y 1.24 no mostraron diferencias significativas en el crecimiento entre las distintas cepas de las dos especies de rizobios en medio TY adicionado de distintas concentraciones de NaCl. La sobreexpresión de la ruta TPS/TPP bajo el control de este tipo de promotores y por tanto de estos vectores plasmídicos no mejoró la tolerancia a estrés salino ni de *S. meliloti* 1021 ni de *M. loti* MAFF303099.

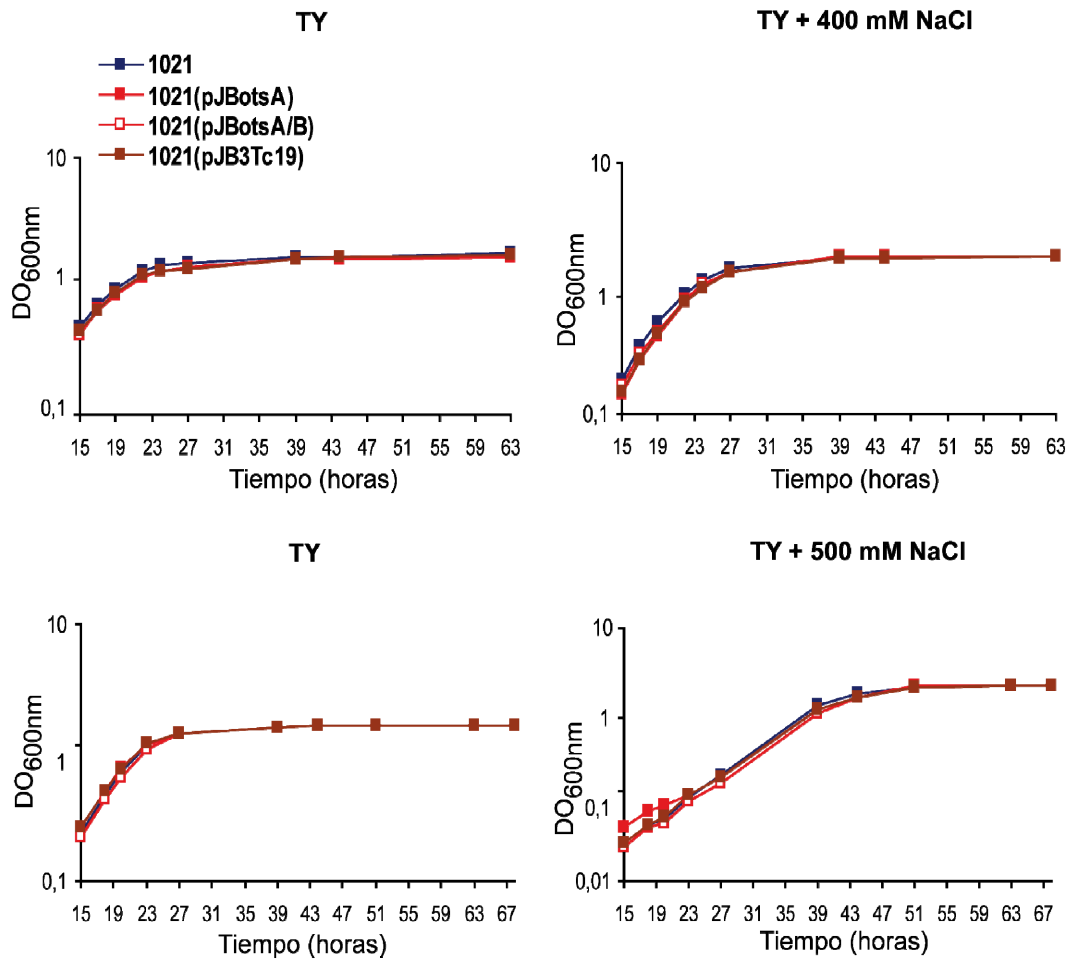


Figura 1.23. Curvas de crecimiento de las cepas de *S. meliloti* 1021 que sobreexpresan genes de la ruta TPS/TPP de síntesis de trehalosa en medio TY adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl.

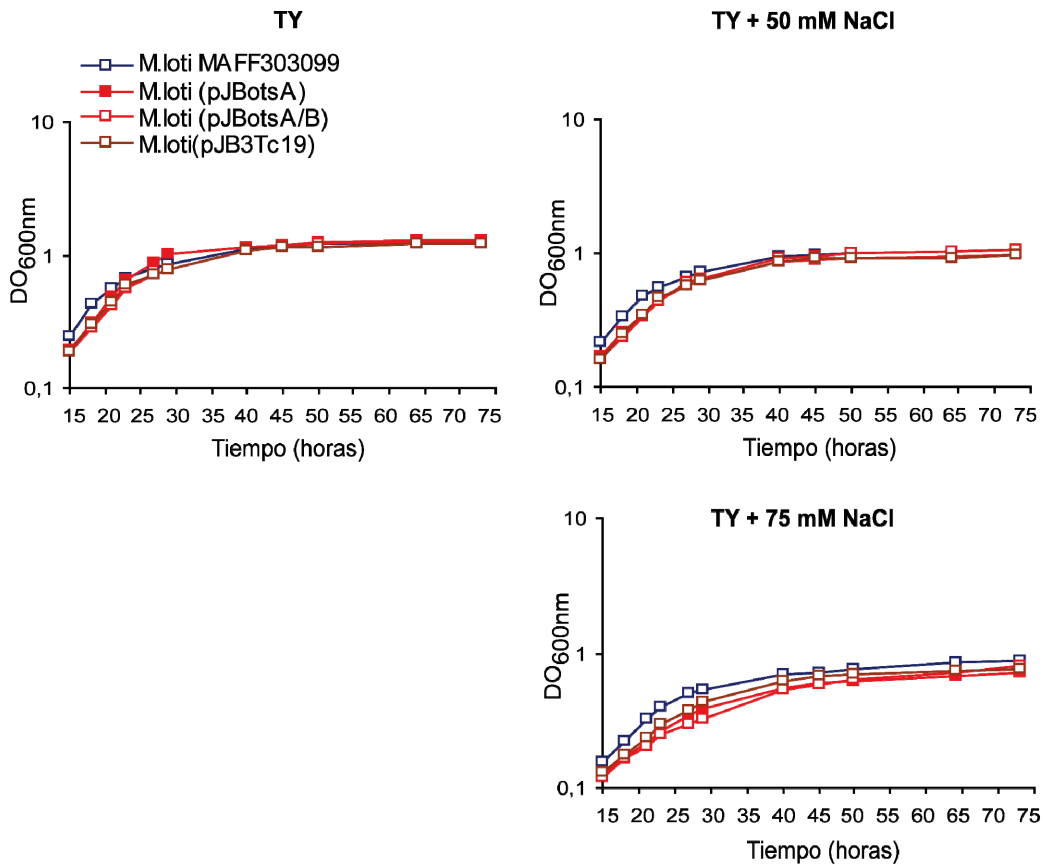


Figura 1.24. Curvas de crecimiento de las cepas derivadas de *M. loti* MAFF303099 que sobreexpresan la ruta TPS/TPP de síntesis de trehalosa en TY adicionado de 50 mM, y 75 mM de NaCl.

DISCUSIÓN: CAPÍTULO 1

La trehalosa es un disacárido que se acumula en una gran variedad de seres vivos: bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos y algunos invertebrados. Este azúcar participa en numerosos procesos generalmente asociados con la protección a estrés (Argüelles, 2000; Elbein *et al.*, 2003). Se han reconocido 5 posibles rutas de biosíntesis de trehalosa y un mismo organismo puede poseer una o varias de estas rutas. La principal ruta a través de la cual los microorganismos sintetizan trehalosa y hasta el momento la única identificada en plantas es la ruta TPS/TPP (OtsAB).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, han caracterizado a nivel genético la biosíntesis de trehalosa en 2 especies distintas de rizobios, *S. meliloti* (simbionte de *Medicago* spp.) y *Mesorhizobium loti* (simbionte de *Lotus* spp.) (Domínguez-Ferreras, 2007). Estos resultados indicaron que en *S. meliloti* la ruta TPS/TPP (*otsAB*) es la más crítica para la síntesis de trehalosa en condiciones de estrés salino. Por otro lado, *M. loti* parece poseer sólo la ruta OtsAB. Las cepas que carecen de todas las rutas biosintéticas caracterizadas tenían muy disminuidos sus niveles de trehalosa, tanto en condiciones de estrés como en situaciones no estresantes. La incapacidad para sintetizar trehalosa se correlacionó en ambas especies de rizobios con una importante reducción de la tolerancia a estrés osmótico (Domínguez-Ferreras, 2007).

En el presente trabajo, hemos conseguido disponer cada uno de los correspondientes genes de síntesis bajo el control de promotores heterólogos no regulados y clonados en vectores plasmídicos. Otros autores han establecido que la sobreexpresión de ciertas rutas biosintéticas de trehalosa conlleva una mejora de la tolerancia a estrés salino en especies de rizobios como *Rhizobium etli* (Suárez *et al.*, 2008) y *Mesorhizobium ciceri* (S. Moussaid, datos no publicados de nuestro laboratorio). En esta tesis se estudió si este fenómeno ocurría también en las especies de *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099. Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de las distintas rutas biosintéticas de trehalosa no mejora la capacidad de osmoadaptación en estas dos especies. En concordancia con el hecho de que la vía OtsA es la más importante en *S. meliloti* (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009), pudimos observar que la sobreexpresión de esta ruta provoca un significativo aumento de la cantidad de trehalosa acumulada en situaciones de estrés. No se observaron efectos similares cuando se sobreexpresaron los genes TreY o TreS. En el genoma de *S. meliloti* 1021 no se ha identificado aún el gen que codifica para una posible trehalosa 6-fosfato fosfatasa y desconocemos si también se incrementan los niveles de trehalosa 6-fosfato intracelulares como consecuencia de la sobreexpresión de *otsA*. A pesar de estos resultados, esta sobreexpresión no mejoró la tolerancia de la bacteria

a estrés salino. La sobreexpresión de los genes *otsAB* a partir del operón heterólogo de *M. loti* MAFF303099 a través del plásmido pJBotsA/B, tampoco fue suficiente como para mejorar la capacidad de crecimiento en condiciones de elevada salinidad. Por su parte *M. loti* MAFF303099, que es más sensible a NaCl que *S. meliloti*, y que sólo posee la ruta OtsAB, tampoco mostró un aumento de su osmotolerancia por sobreexpresión de *otsAB*. Desconocemos si se incrementan también los niveles de trehalosa citoplasmática en *M. loti* MAFF303099, ya que no fue posible determinar la trehalosa acumulada en medios de elevada salinidad. Tal vez el método utilizado es insuficientemente sensible como para detectar pequeñas variaciones en la trehalosa intracelular en esta bacteria. Nuestros resultados contrastan con otros obtenidos en la bacteria *Rhizobium etli*, en la que la sobreexpresión de la ruta OtsA parece aumentar la acumulación de trehalosa e incrementar la supervivencia de la bacteria bajo condiciones de estrés salino en vida libre (Suárez *et al.*, 2008). Además, plantas de judía inoculadas con la cepa que sobreexpresaba *otsA* bajo el control de un promotor *lac*, mostraron también mayor tolerancia a sequía, asociada a un mayor número de nódulos y mayor contenido de trehalosa en los mismos, mayor actividad nitrogenasa y biomasa aérea en comparación con plantas inoculadas con la cepa silvestre. No obstante, en este trabajo las aparentes mejoras provocadas por la sobreexpresión del gen *otsA* solo fueron patentes bajo condiciones de estrés muy intenso (Suárez *et al.*, 2008), en las que se compararon la mayor o menor mortalidad de plantas y bacterias. Particularmente para las bacterias en vida libre se determinó la capacidad de supervivencia de las distintas cepas y no tanto una mejora real del crecimiento, como se intentó en el presente trabajo.

En resumen, no hemos podido constatar que el incremento de la capacidad de síntesis y acumulación de trehalosa por estas especies de rizobios, particularmente *S. meliloti*, mediada por sobreexpresión de genes de varias rutas biosintética, conlleve una mejora de la tolerancia a estrés. Además, no se ha ensayado la posibilidad de cambios en la eficiencia de fijación de nitrógeno y en el crecimiento de la planta, en especial en condiciones de salinidad o sequía. No obstante, el manejo de vectores de expresión tiene una serie de inconvenientes, como son su inestabilidad en ausencia de presión selectiva, el a veces excesivo número de copias génicas que proporcionan o la posibilidad de transferencia genética horizontal, lo que los hacen sólo parcialmente útiles en estudios de manipulación genética. Desde un punto de vista de aplicación práctica, sería mucho más deseable, aunque también más dificultosa, la incorporación estable de los genes de interés en el genoma de la bacteria, a fin de evitar los mencionados inconvenientes.

Por otro lado, la acumulación de trehalosa intracelular se relaciona no solo con su biosíntesis, sino también con la presencia de actividades hidrolíticas, como trehalasas y otras enzimas capaces de hidrolizar la trehalosa.

En muchos organismos, el catabolismo de trehalosa proviene principalmente por la vía trehalasa (EC.2.1.28), enzima que cataliza la formación de dos moléculas de glucosa a partir de trehalosa (Horlacher *et al.*, 1996; Elbein *et al.*, 2003). Sin embargo, también se han descrito otras enzimas para la hidrólisis de trehalosa y trehalosa 6-fosfato, como son la trehalosa fosforilasa, la trehalosa 6-fosfato fosforilasa y la trehalosa 6-fosfato hidrolasa (Andersson *et al.*, 2001; Belocopitow y Marechal, 1970; Rimmelé y Boos, 1994). La existencia de varias rutas de biosíntesis de trehalosa es una propiedad muy común entre los rizobios. Aunque recientemente ha sido realizada la caracterización genética de la biosíntesis de este compuesto en las especies de *S. meliloti* 1021 y *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Domínguez-Ferreras, 2007; Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009), apenas se ha descrito la existencia de trehalasa u otras enzimas hidrolíticas de trehalosa en estas bacterias. Si bien se ha puesto de manifiesto la presencia de algunas de estas actividades hidrolíticas en ciertas especies de rizobios, tampoco se conoce su relevancia fisiológica, ni han sido caracterizadas genéticamente o asociadas a ningún gen (Salminen y Streeter, 1986; Hoelzle y Streeter, 1989; Dardanelli *et al.*, 2000).

Un análisis del genoma de *S. meliloti* 1021 nos permitió identificar el gen SMb20968, localizado en el plásmido simbiótico pSymB, que codifica para una proteína con homología de secuencia a trehalasas bacterianas, y que además posee dominios funcionales típicos de trehalasas y otras glucohidrolasas. En especial, tiene similitud con la proteína TreF de *E. coli* (Horlacher *et al.*, 1996).

Se ha determinado el perfil de expresión de SMb20968 de *S. meliloti* 1021 en respuesta a un choque salino, desde fase exponencial hasta entrada en fase estacionaria. Los datos de expresión revelaron una clara inducción del gen SMb20968 entre las 4 y 8 horas después de la adición de sal. Estos resultados de expresión génica estarían en consonancia con los de las trehalasas de *E. coli* (TreA y TreF), cuya síntesis es inducida en condiciones de elevada osmolaridad (Horlacher *et al.*, 1996).

En los estudios sobre la capacidad de crecimiento en respuesta a diversos tipos de estreses, se observó que un mutante en el gen SMb20968 de *S. meliloti* no presentaba diferencias respecto a la cepa parental en ninguna de las condiciones ensayadas, en medios con elevadas concentraciones de NaCl o sacarosa. Tampoco hubo diferencias de crecimiento a temperaturas supraóptimas, ni en medios con un pH

ácido. En estas condiciones, la pérdida de función de SMb20968 no pareció tener ningún efecto en la osmotolerancia de la bacteria en vida libre.

Se sabe que la presencia en el medio de trehalosa en bajas concentraciones es capaz de aliviar los efectos del estrés osmótico, actuando como un eficiente osmoprotector no acumulado en *S. meliloti* (Gouffi *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, se ha descrito que mutantes en trehalasas de ciertos organismos no pueden crecer en medios con trehalosa como única fuente de carbono, tanto en condiciones normales como hiperosmóticas (Boos *et al.*, 1987; Nwaka *et al.*, 1995). El mutante en el gen SMb20968 mostró una capacidad de osmoadaptación similar a la cepa silvestre cuando se dispuso en el medio de pequeñas cantidades de trehalosa. Tampoco hubo diferencias significativas en el crecimiento de estas cepas en presencia o ausencia de NaCl cuando se dispuso trehalosa en el medio como única fuente de carbono. Estos resultados estarían indicando que la trehalosa puede ser utilizada eficientemente como fuente de carbono y energía por un mutante SMb20968⁻ de *S. meliloti* 1021.

No obstante, la sobreexpresión del gen SMb20968 por células de *S. meliloti* 1021 cultivadas en medios salinos, provocó una reducción de la cantidad de trehalosa intracelular, resultado que sería esperable si SMb20968 codificase para una actividad trehalasa o trehalosa hidrolasa. A pesar de que la cantidad de trehalosa acumulada fue inferior a la de la cepa parental, esta diferencia no pareció ser importante como para afectar a la tolerancia de la bacteria a estrés salino.

Aunque hay muy pocos trabajos en bacterias Gram negativas y en especial en *Rhizobium* relacionados con el catabolismo de la trehalosa, se pudo constatar la existencia de actividad trehalasa en extractos de células de *S. meliloti* en fase estacionaria, desarrollando los protocolos descritos por Horlacher (1996) y Dardanelli (2000). Los datos de actividad observados en condiciones de elevada salinidad respondieron a un patrón muy diferente del observado para la expresión del gen SMb20968. Los niveles de actividad trehalasa se mantuvieron igual a lo largo de la curva de crecimiento, tanto en presencia como en ausencia de NaCl. Asimismo, se determinó actividad trehalasa en un mutante SMb20968⁻ de *S. meliloti* en estas mismas condiciones y los resultados obtenidos indicaron que la inactividad del gen SMb20968 no causa ningún tipo de cambio en los niveles de actividad trehalasa en *S. meliloti* 1021, en las condiciones ensayadas. Tampoco, fue posible cuantificar las variaciones en la acumulación intracelular de trehalosa. Se trata de un dato que podría aportar información relevante en estas cepas indicando la correlación entre la actividad catalítica y la concentración del sustrato. Tal vez, la imposibilidad en la determinación de trehalosa se deba a que el método empleado tenga una sensibilidad muy baja.

Por tanto, cabe la posibilidad de que la hidrolasa codificada por este gen no sea una verdadera trehalasa o si lo fuera, podría no ser funcional o ser activa en determinadas condiciones, diferentes a las utilizadas en este trabajo. En algunos organismos, como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, existen varias trehalasas sujetas a diferentes tipos de regulación (Nwaka y Holzer, 1998). En micobacterias, la trehalasa es considerada una enzima esencial para estos organismos y la de *M. smegmatis*, a diferencia de la de *M. tuberculosis*, requiere Mg^{2+} y fosfato inorgánico para mantenerse activa (Carroll *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que en *S. meliloti*, el gen SMb20968 esté osmorregulado transcripcionalmente, y que su producto o la actividad del mismo, de ser una trehalasa, pudieran estar sujetos a otros procesos de regulación aún desconocidos.

Anteriormente se ha citado que muchos organismos tienen la capacidad de acumular trehalosa a través de una o varias rutas de biosíntesis y conjuntamente utilizan varias enzimas hidrolíticas para el catabolismo de este disacárido. Por el contrario, existen otros en los cuales se han detectado las rutas de síntesis OtsAB, TreYZ y TreS pero no poseen ninguna actividad hidrolítica para trehalosa. Este es el caso de bacterias como *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Propionibacterium freudenreichii* (Makihara *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2003) Wolf *et al.*, 2003; Makihara *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2007). Se trata de microorganismos de diversas naturaleza y fisiología en los que los autores proponen a la enzima TreS como un sustituto de la trehalasa, que estaría encargada de degradar la trehalosa intracelular en condiciones especiales para cada uno de los casos. En *Corynebacterium* por ejemplo, la síntesis de trehalosa está mediada principalmente por la vía TreYZ y sin embargo, los genes *otsA* y *treS* se inducen transcripcionalmente tras un choque hiperosmótico. Además, TreS actuaría como una trehalasa hidrolizando la trehalosa sintetizada y reciclándola como fuente de carbono una vez que ha pasado la situación de estrés en la bacteria. Es posible que algo similar esté ocurriendo también en *S. meliloti*, una bacteria que posee al menos 3 rutas diferentes de biosíntesis de trhalosa, en la que se ha observado que la vía OtsAB es la más importante en condiciones de estrés y en la que no se sabe aún el papel que podría desempeñar TreS (Domínguez-Ferreras, 2007). Aunque en el genoma de este rizobio existen anotados un gran conjunto de genes con dominios glicosil hidrolasa, hasta el momento no se han detectado ni identificado proteínas con actividad trehalasa, trehalasa fosforilasa, trehalosa 6-fosfato fosforilasa y/o trehalosa 6-fosfato hidrolasa. Por tanto, en *S. meliloti* cabe la posibilidad de que esta enzima reversible TreS pueda

tener el papel de una trehalasa, degradando trehalosa en vez de sintetizarla bajo condiciones muy específicas.

Aunque se desconoce aún la función biológica que podría desempeñar la ruta de degradación de trehalosa en *Rhizobium*, trabajos recientes lograron identificar en *S. meliloti* 1021 al menos dos rutas para el transporte y utilización de este disacárido cuando es aportado exógenamente (Jensen *et al.*, 2005; Willis y Walker, 1999). Estos autores describieron dos sistemas de transporte para disacáridos como sacarosa, maltosa y trehalosa codificados por dos operones. De modo que uno de ellos, el denominado *thuEFGKAB*, está implicado en transportar trehalosa y maltosa principalmente. Asimismo, estos autores sugieren que los genes *thuAB* codifican para la mayor ruta de utilización de trehalosa en *S. meliloti* y mutantes en los genes *thuA* y *thuB* tienen disminuida su capacidad de crecimiento en medios con trehalosa como fuente de carbono (Jensen *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta la localización en el plásmido pSymB del gen SMb20968 así como el análisis “in silico” de su entorno genético, se puede apreciar que esta putativa hidrolasa se encuentra también formando un operón junto con genes que codifican para un sistema de transporte de azúcares. Estas observaciones nos llevan a pensar a cerca de la existencia de un tercer sistema de transporte específico de disacáridos α -glicósidos en *S. meliloti*. Este sistema lo formarían los genes SMb20969, SMb20970, SMb20971 y SMb20972 y podría estar encargado también de transportar trehalosa exógena. En este sistema el gen SMb20968, de modo similar a lo que ocurre con los genes *thuAB*, podría intervenir en el catabolismo del disacárido una vez incorporado por la bacteria.

Una mutación del gen SMb20968 de *S. meliloti* 1021 no provocó un fenotipo en adaptación a estrés y tampoco tuvo un efecto significativo sobre la nodulación y la fijación de nitrógeno en alfalfa. Este mutante formó un número de nódulos similar a la cepa parental en simbiosis con alfalfa y desconocemos por tanto la implicación del gen en este proceso. No obstante, se sabe que mutantes de *S. meliloti* incapaces de captar y utilizar trehalosa son menos competitivos en la colonización de raíces de alfalfa (Jensen *et al.*, 2002 y 2005). Estos autores relacionan la acumulación de trehalosa con la disminución de la capacidad para adaptarse a los distintos tipos de estreses que la bacteria podría afrontar durante la colonización de la raíz y las primeras etapas de la infección del nódulo.

ANEXOS: CAPÍTULO 1

Anexo 1. Construcción de un mutante en el gen SMb20968 de *S. meliloti* 1021.

La obtención del mutante en el gen SMb20968 se realizó a través del método de doble recombinación homóloga sobre el genoma de *S. meliloti* 1021. Para ello, a partir de ADN genómico de la cepa silvestre 1021, se amplificó un fragmento de 3,2 Kb que contenía el gen SMb20968. Los oligonucleótidos que se emplearon fueron los siguientes:

SMb20968f 5'- TGGCTTCGTTGGCACAGATA-3'

SMb20968r 5'- CCGTTCTACTGGACCTTCAT-3'

El amplificado resultante se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy formándose el plásmido **pGtreF** (Figura 1.25a) de un tamaño de 6,2 Kb. Posteriormente, pGtreF se amplificó por una PCR inversa que originó una delección del gen SMb20968 de 1,150 Kb. El producto que se obtuvo fue digerido con *Sma*I y religado después para dar lugar al plásmido **pGtreFinv** de un tamaño de 5 Kb (Figura 1.25b). Los oligonucleótidos que se utilizaron en esta segunda PCR fueron los siguientes:

treFinv-F 5'-tt**accggg** CGGTAGACATAATCGTAGCG-3'
*Sma*I

treFinv-R 5'-tt**accggg** TATCTCCTGTGGGATGGACT-3'
*Sma*I

De esta forma, el gen SMb20968 presenta una delección y dos sitios *Sma*I nuevos que fueron aprovechados para insertar un cassette de resistencia a Sm/Spc. Este cassette se obtuvo a partir del vector pHP45ΩSm-Spc que fue digerido con *Sma*I y el fragmento resultante de 2 Kb fue purificado y después ligado a pGtreFinv dando lugar al plásmido **pGtreFSS** de un tamaño de 7,2 Kb (Figura 1.25c). Este último plásmido se digirió con *Eco*RI, liberando un fragmento de 4,2 Kb que se purificó y se clonó en el vector suicida pSup202pol4, originando finalmente el plásmido **pStreFSS** (con un tamaño de 10,9 Kb). Esta última construcción fue movilizada mediante una conjugación biparental desde la cepa donadora S17.1 de *E. coli* hasta la cepa receptora 1021 de *S. meliloti*. Se seleccionaron aquellos transconjugantes que fueron Sm/Spc resistentes y Tc sensibles, en los que teóricamente se produjo el intercambio alélico como consecuencia de una doble recombinación homóloga.

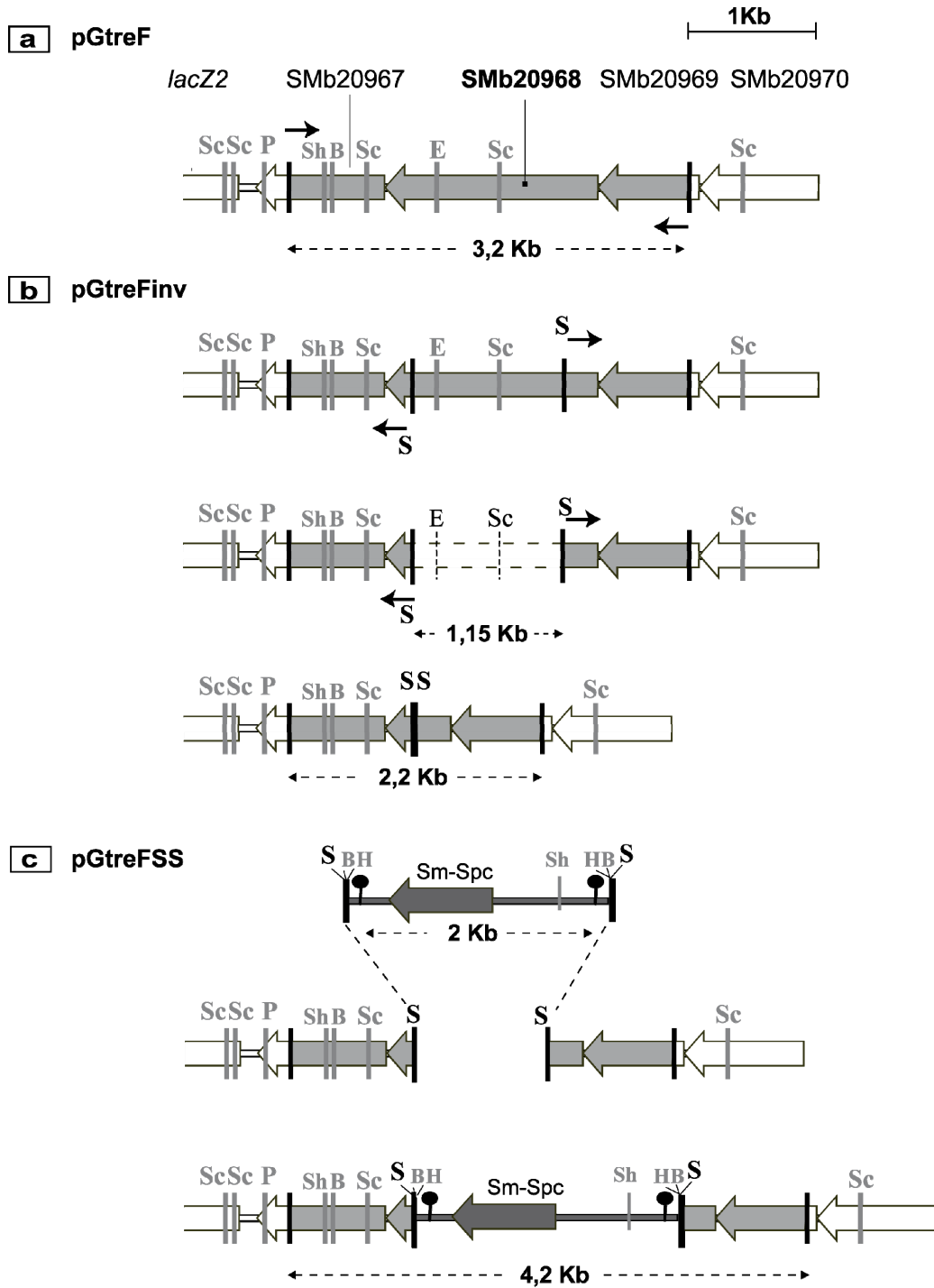


Figura 1.25. Esquema de las distintas etapas para la construcción *in vitro* de una mutación en el gen SMB20968, a través de la obtención de los plásmidos pGtreF (a), pGtreFinv (b) y pGtreFSS (c). **Sc**; *SacI*, **P**; *PstI*, **Sh**; *SphI*, **B**; *BamHI*, **E**; *EcoRI*, **S**; *SmaI*, **H**; *HindIII*.

Se verificó la eficacia de dicho intercambio alélico en un grupo de 9 transconjugantes, mediante hibridación del DNA genómico digerido con *SacI* frente al fragmento *EcoRI* de 2,2 Kb del plásmido pGtreFInv, previamente purificado y marcado con digoxigenina (Figura 1.26a), el cual hibridó con 3 fragmentos *SacI* del genoma de *S. meliloti* 1021, dos de 1 Kb y un tercero de 1,96 Kb (Figuras 1.26b y 1.27). La delección y posterior inserción del cassette Sm-Spc dentro del gen SMb20968 provocó que el fragmento de ADN de 1,96 Kb pasara a tener un tamaño de 3,9 Kb, simultáneamente a la pérdida de uno de los fragmentos de 1 Kb, en las cepas mutantes (Figuras 1.26c y 1.27).

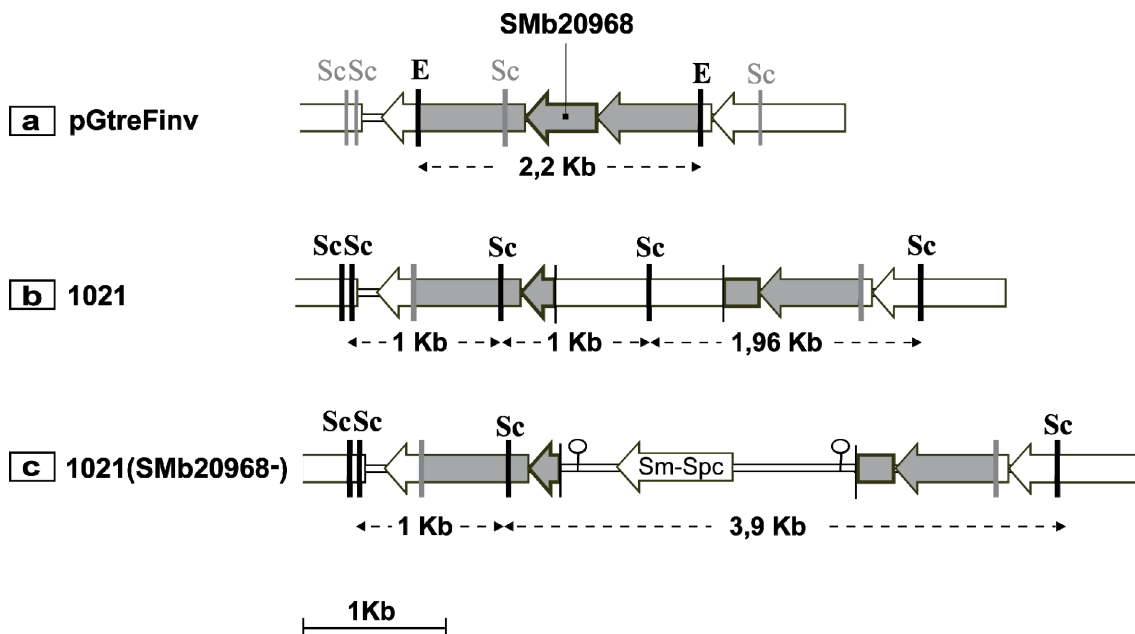


Figura 1.26. Esquema de la construcción del mutante en el gen SMb20968 de *S. meliloti* 1021. a; fragmento *EcoRI* (E) de 2,2,Kb proveniente de pGtreFInv marcado y utilizado como sonda en la hibridación. b; fragmentos *SacI* (Sc) teóricos que hibridan con la sonda en la cepa parental 1021. c; fragmentos *SacI* que hibridarían con la sonda en la cepa mutante 1021 (SMb20968⁻).

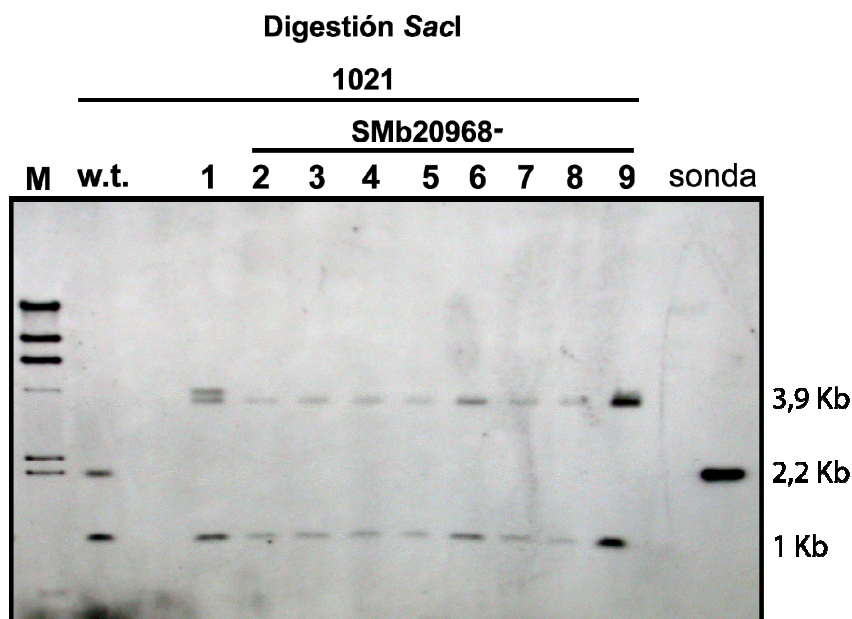


Figura 1.27. Comprobación de mutantes SMB20968^r de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *Sacl*, usando como sonda la banda *EcoRI* de 2,2 Kb de pGtreFInv. Se muestran los transconjugantes mutantes (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) y un transconjugante no mutante (1). w.t.; cepa silvestre de *S. meliloti* 1021. M; Marcador de peso molecular (DNA del fago Lambda digerido con *HindIII*) marcado con digoxigenina.

Anexo 2. Construcción de los plásmidos pJBotsA/B, pJBotsA, pJBtreY, pJBtreF.

2.1. Construcción del plásmido pJBotsA/B que sobreexpresa el operón *otsAB* de *M. loti* MAFF303099.

Para la obtención de esta construcción se amplificó un fragmento de 2,9 Kb a partir de ADN genómico de *M. loti* MAFF303099 que contenía los genes *otsA* (mll0691) y *otsB* (mll0690). Los oligonucleótidos que se utilizaron para la reacción de amplificación fueron los siguientes:

otsA/BMloti-exp-F 5'-ttaggatccACTTCCCGAATGAGGCTGGT-3'
*Bam*HI

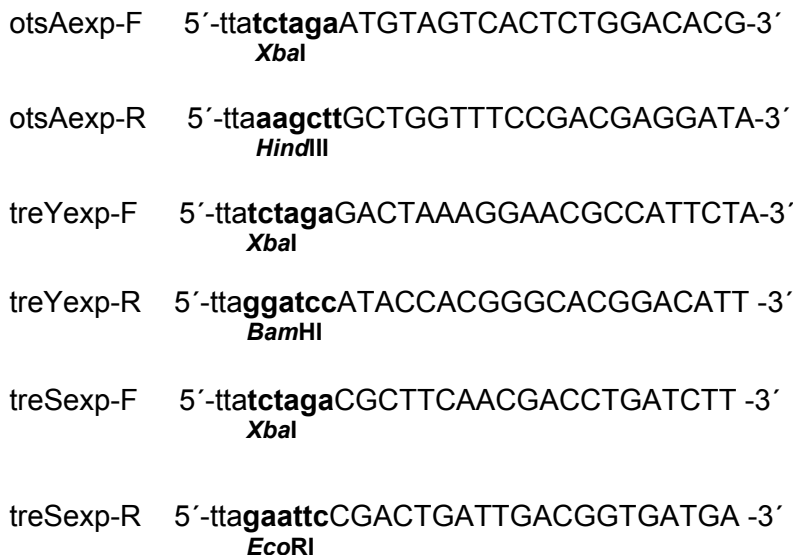
otsA/BMloti-exp-R 5'-ttaaagcttGGACAGGTGAAATCCATGTG-3'
*Hind*III

El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido **pGotsA/Bexp** (Figura 1.28a). Después, el fragmento *HindIII/BamHI* de 2,9

Kb de pGotsA/Bexp fue clonado en el vector pJB3Tc19 (de 7 kb), llegando a obtener finalmente la construcción **pJBotsA/B** (Figuras 1.28a y 1.28c). Por último, la construcción fue introducida en las cepas de *M. loti* MAFF303099 y *S. meliloti* 1021 mediante conjugación biparental y utilizando la cepa S17.1 de *E. coli* como donadora.

2.2. Construcción de los plásmidos pJBotsA, pJBtreY y pJBtreS.

Los clones fueron contruidos a partir de fragmentos amplificados del ADN genómico de *S. meliloti* 1021, que contenían los genes *otsA* (SMa0233), *treY* (SMb20574) y *treS* (SMb20099), respectivamente. El tamaño de cada uno de los productos amplificados está representado en la figura 1.28b y los oligonucleótidos que se emplearon fueron los siguientes:



Los fragmentos resultantes de las reacciones de amplificación fueron clonados en el vector pGEM[®]-T Easy originando los plásmidos **pGotsAexp**, **pGtreYexp** y **pGtreSexp**. El vector pJBotsA se obtuvo mediante la ligación del fragmento *HindIII/XbaI* de 2,38 Kb procedente de pGotsAexp con el vector pJB3Tc19 (Figura 1.28b1). pJBtreY fue construido a través de la ligación del fragmento *XbaI/BamHI* de 3,2 Kb procedente de pGtreYexp (Figura 1.28b2). Finalmente, el plásmido pJBtreS se originó a partir de la digestión *XbaI/EcoRI* de pGtreSexp y fragmento resultante (de 2,4 Kb) fue clonado en pJB3Tc19 (Figura 1.28b3).

Todos los plásmidos fueron movilizados a la cepa 1021 de *S. meliloti* de igual forma que pJBotsA/B. En la figura 4b se muestra la representación esquemática de las regiones génicas que fueron clonadas en los vectores pGEM[®]-T Easy y pJB3Tc19.

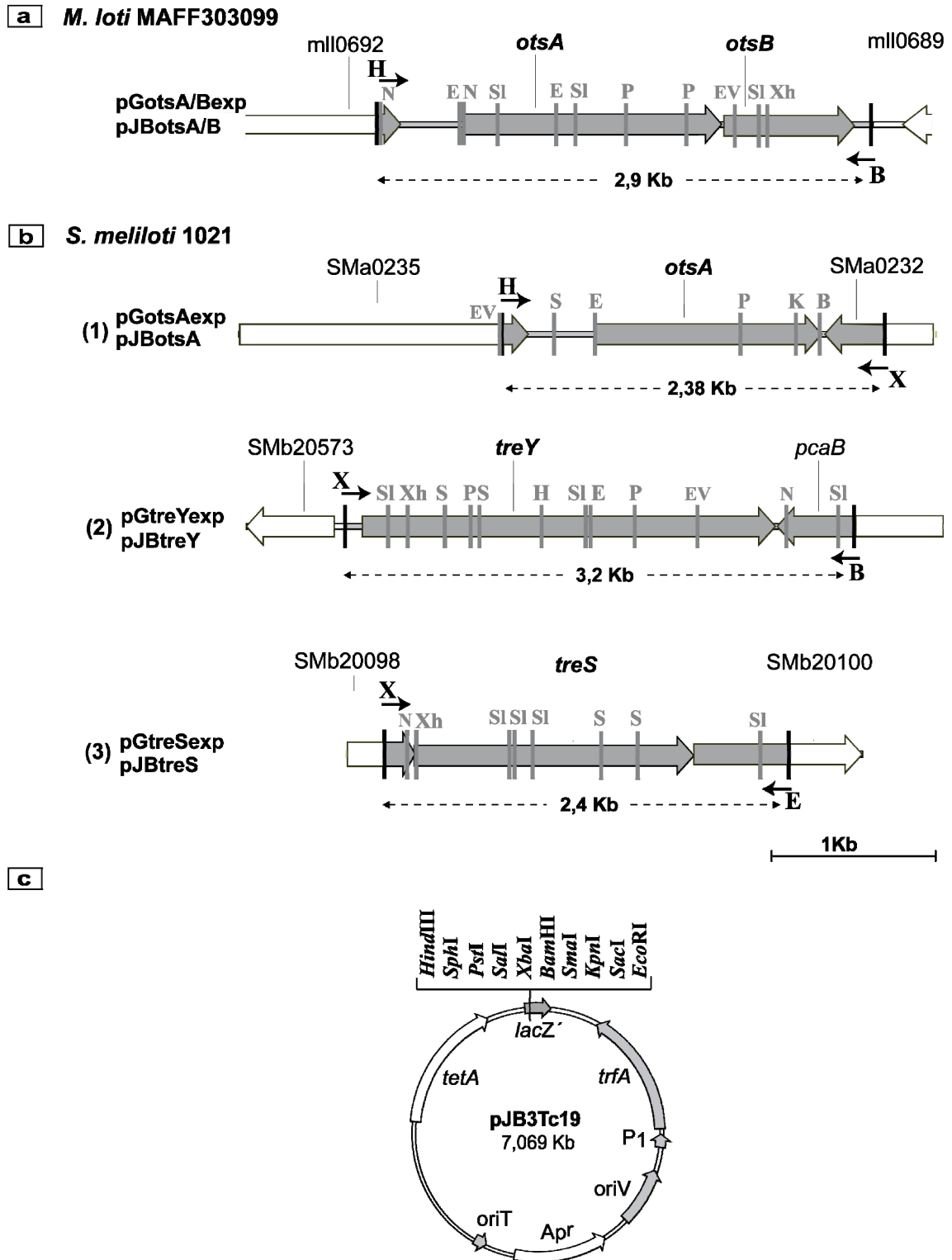


Figura 1.28. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pJBotsA/B (a), pJBotsA (b1), pJBtreY (b2) y pJBtreS (b3). Mapa físico del vector de clonación pJB3Tc19 (c). Se muestra el sitio de clonación múltiple (MCS ▼) situado aguas abajo del promotor *lac*. N; *NotI*, SI; *SalI*, E; *EcoRI*, K; *KpnI*, B; *BamHI*, H; *HindIII*, S; *SmaI*, P; *PstI*, X; *XbaI*, Xh; *XhoI*, EV; *EcoRV*.

2.3. Construcción del plásmido pJBtreF que sobreexpresa el gen SMb20968 de *S. meliloti* 1021.

La construcción del plásmido pJBtreF se realizó a partir del plásmido pGtreF, el cual está constituido por el vector pGEM[®]-T Easy y un inserto amplificado de 3,2 Kb que contiene el gen SMb20968 (Figura 1.29a). Para obtener el gen SMb20968 clonado en el vector pJB3Tc19, se llevaron a cabo dos digestiones en pGtreF. La primera fue con la enzima *Bam*HI que linearizó el plásmido de 6,2 Kb. Después, aprovechando *Sph*I del sitio de clonación múltiple del vector, se hizo una segunda digestión que dio lugar a un inserto de 2,9 Kb que posteriormente se ligó al vector pJB3Tc19 digerido con *Sph*I y *Bam*HI, originando finalmente el plásmido **pJBtreF** de 9,9 Kb (Figura 1.29b).

Del mismo modo que los clones anteriores, pJBtreF fue introducido en la cepa 1021 de *S. meliloti* mediante una conjugación biparental empleando la cepa S17.1 de *E. coli* como donadora.

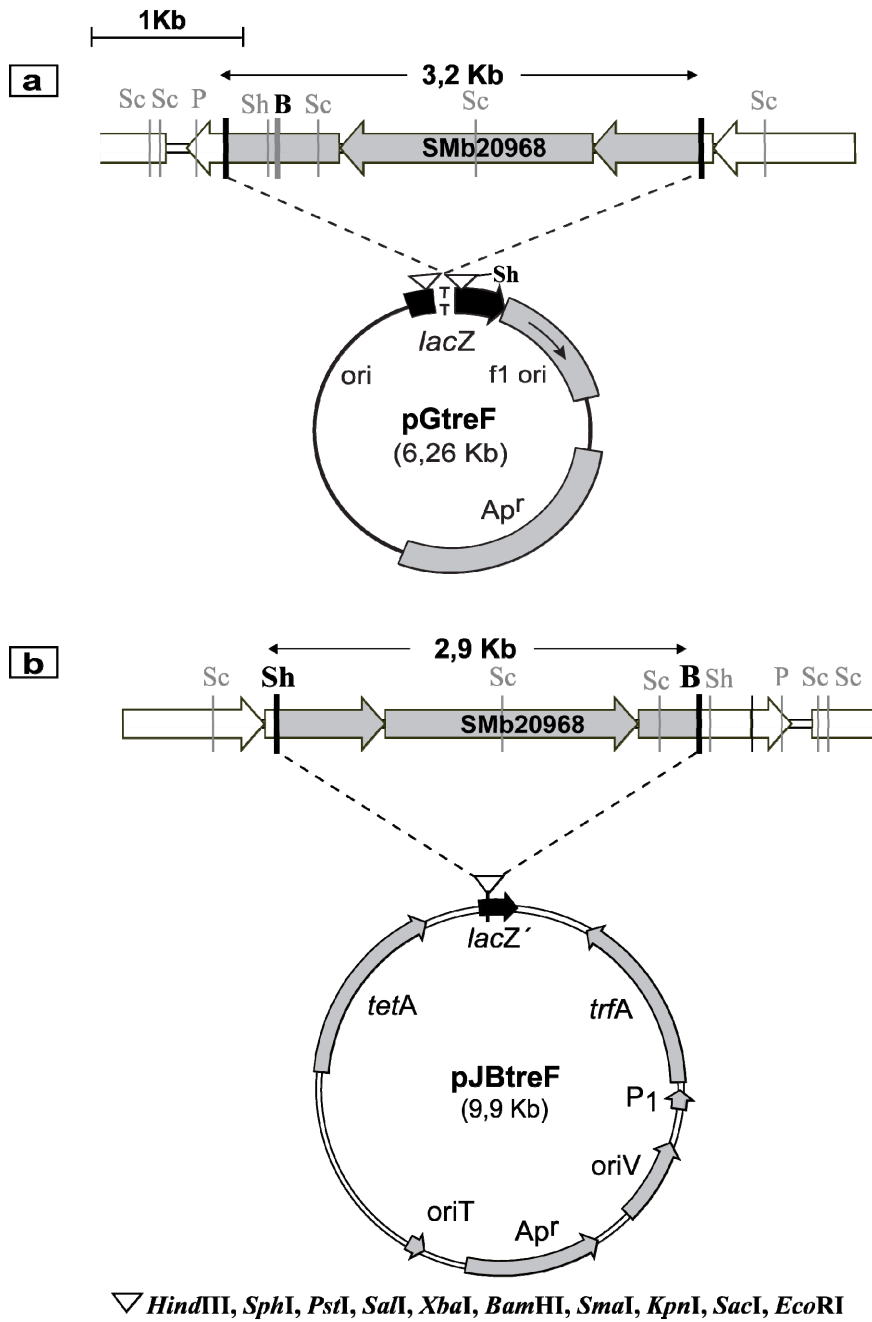


Figura 1.29. Mapa de los plásmidos pGtreF y pJBtreF. ▽ Sitio de clonación múltiple. **B**; *BamHI*, **Sh**; *SphI*, **Sc**; *SacI*, **P**; *PstI*.

RESULTADOS: CAPÍTULO 2

Capítulo 2. IMPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pSymb DE *Sinorhizobium meliloti* EN OSMOADAPTACIÓN: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES IMPORTANTES PARA TOLERANCIA A ESTRÉS.

1. VERIFICACIÓN DE LA INDUCIBILIDAD POR CHOQUE OSMÓTICO DE GENES OSMORREGULADOS EN *S. meliloti* 1021.

Está ampliamente aceptado que los datos de expresión génica derivados de experimentos de microarrays deben ser considerados como tentativos hasta que puedan ser verificados por otras técnicas. Este estudio se inició con la verificación de los niveles de inducción por estrés de algunos genes de *S. meliloti* 1021 que aparecieron como osmorregulados en experimentos de microarrays (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). En dicho trabajo, de los 1003 genes que aparecieron diferencialmente expresados, se identificaron 444 genes como inducidos y 539 como reprimidos. Del conjunto de genes inducidos se hizo una primera selección con aquellos que aparecieron osmorregulados en todas las variables experimentales ensayadas, llegándose a obtener un grupo de 157 genes, de los cuales 135 (el 86%) codificaban proteínas de función desconocida o hipotética. A partir de la anotación de la secuencia del genoma de *S. meliloti* (<http://bioninfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/rhime/index.html>), se agruparon los genes atendiendo a su posible función: genes que codificaran para proteínas con homología global o parcial con proteínas relacionadas con respuesta a estrés en otros organismos, genes que codificaban proteínas con supuesta actividad enzimática, reguladores transcripcionales, proteínas de secreción o asociadas a membrana.

Finalmente, se seleccionó un grupo de 16 genes (Tabla 2.1) para verificar su regulación por choque osmótico y utilizar los datos de expresión diferencial como dato relevante para decidir su posterior caracterización. 14 de estos genes habían mostrado expresión incrementada tras un choque osmótico, mientras que SMb20651 y SMc02163 fueron genes aparentemente reprimidos y que además eran de interés para otros trabajos llevados a cabo en nuestro grupo. Los genes SMb20345 y SMb21044, si bien no aparecieron como diferencialmente expresados en microarrays, fueron seleccionados por tener una posible vinculación funcional o genética con otros genes que si habían aparecido como osmorregulados.

La determinación de los cambios de expresión génica fue llevada a cabo mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, a partir de cultivos de *S. meliloti* 1021 en fase exponencial (a una DO_{600nm} de 0,4), sometidos a un choque salino (400 mM NaCl). La

expresión relativa de cada gen se normalizó con la del gen codificante para el ARNr 16S (SMc03224) de *S. meliloti*, que fue el gen de referencia utilizado en esta técnica, ya que su expresión no varía durante la fase exponencial de crecimiento de la bacteria

Tabla 2.1. Genes seleccionados para verificar su expresión diferencial por choque osmótico mediante PCR cuantitativa.

Gen ID (Anotación)	Descripción de la proteína	M
SMa0233 (<i>otsA</i>)	Trehalose-6-phosphate synthase	4,59
SMb21484 (<i>rpoE5</i>)	Putative RNA polymerase sigma-E factor (sigma-24)	3,91
SMb20249 (<i>ino1</i>)	Conserved hypothetical protein; Myo-inositol-1-phosphate synthase	7,20
SMb20094	Putative phospholipase D	4,96
SMb20345	Transmembrane efflux protein; Acr-B	-
SMb20346	Transmembrane efflux protein; Acr-A	3,42
SMb20347	Transcriptional regulador; Acr-R	3,30
SMb21406	Conserved hypothetical protein; Ku-like protein	2,41
SMb21407	Conserved hypothetical protein; Ku-like protein	2,33
SMb20651	Hypothetical protein; Acyl carrier protein	-1,73
SMb21448	Putative DNA polymerase related protein	2,94
SMb20537	Transcriptional regulator	4,24
SMb20522	Hypothetical protein	3,11
SMc00885	Hypothetical transmembrane signal peptide protein	2,34
SMb21044	Putative ATP-dependent DNA ligase	-
SMc02163 (<i>pgi</i>)	Glucose-6-phosphate isomerase	-2,46

M; Log₂ del valor de expresión diferencial derivado de los experimentos de microarrays (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006).

Los datos mostrados en la Tabla 2.2 corresponden a la expresión relativa de cada gen a los 60 minutos después de la adición de sal, respecto a cultivos control en medio mínimo sin NaCl añadido.

Tabla 2.2. Cuantificación por RT-PCR de la expresión diferencial de un grupo de genes de *S. meliloti* 1021 tras un choque salino.

Gene ID	Datos de RT-PCR ^a Ratio (n=2)	SD	Tipo de cambio	Microarray (M)
SMa0233 (<i>otsA</i>)	17,67	6,59	Inducción	4,59
SMb21484 (<i>rpoE5</i>)	-	-	Inducción	3,91
SMb20249 (<i>ino1</i>)	-	-	Inducción	7,20
SMb20094	-	-	ND	4,96
SMb20345	5,94	3,16	Inducción	-
SMb20346	-	-	ND	3,42
SMb20347	3,74	2,2	Inducción	3,30
SMb21406	-	-	Inducción	2,41
SMb21407	-	-	ND	2,33
SMb20651	1,53	0,89	Sin cambio	-1,73
SMb21448	1,61	0,47	Inducción	2,94
SMb20537	18,74	5,45	Inducción	4,24
SMb20522	-	-	ND	3,11
SMc00885	-	-	ND	2,34
SMb21044	5,87	3,43	Inducción	-
SMc02163 (<i>pgi</i>)	0,346	0,093	Represión	-2,46

a; Ratio;n=2 Media de al menos dos réplicas técnicas de PCR y de al menos dos muestras de ARN independientes. SD; Desviación estándar. ND; No detectable.

Los genes que mostraron cambios en su expresión tras un choque salino fueron *otsA*, *rpoE5*, SMb20249 (*ino1*), SMb20345, SMb20347, SMb21406, SMb21044, SMb21448, SMb20537, SMb20651 y SMc02163.

Se cuantificó la expresión del gen SMb20345 que junto a SMb20346 y SMb20347 podrían formar parte de un operón osmóticamente inducible. Aunque se consiguió determinar la inducibilidad de SMb20345 y SMb20347 en respuesta a un choque salino, el ARNm del gen SMb20346 no pudo ser detectado ni en las condiciones control ni en condiciones de salinidad. Lo mismo ocurrió con el gen SMb21407, cuyo producto de amplificación tampoco fue detectado en ninguna de las condiciones, a pesar de que forma un posible operón con SMb21406, cuya

inducibilidad por estrés salino si pudo ser verificada (aunque no pudo ser cuantificada). Por su parte, SMb20094 no mostró expresión en ninguna de las dos condiciones, a pesar de que su expresión aparecía fuertemente incrementada en los experimentos de microarrays.

Los genes *rpoE5* y SMb20249 aparecieron expresados en estas condiciones de salinidad, pero no pudo cuantificarse su expresión relativa porque los niveles de transcrito en condiciones control (medio mínimo sin NaCl) no fueron lo suficientemente altos como para que pudieran detectarse en la reacción de amplificación.

Se cuantificó también la expresión de SMb21044, que a pesar de no haber aparecido como osmorregulado en los experimentos de microarrays, podría formar parte de un sistema de reparación de ADN de cadena doble por recombinación no homóloga (NHEJ), junto con los genes SMb21406 y SMb21407. Esta ruta de reparación de ADN ha sido descrita recientemente en *S. meliloti* (Kobayashi *et al.*, 2007). Aunque SMb21406 y SMb21407 forman un operón, solamente pudo verificarse la inducibilidad por choque salino de SMb21406. De modo semejante a lo ocurrido con los genes *rpoE5* y SMb20249, los niveles de transcrito en las condiciones control fueron insuficientes, por lo que no pudo cuantificarse su expresión diferencial.

Por otro lado, se estudiaron los genes SMb20651 y SMc02163 que aparecieron osmóticamente inhibidos (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006) y se confirmó la represión a través de esta técnica cuantitativa. En el caso del gen SMb20651, aunque su perfil de expresión no fue igual al observado en experimentos de microarrays, si se observó que su expresión se reduce poco tiempo después de la aplicación del choque salino (Tabla 2.2, Figura 2.1).

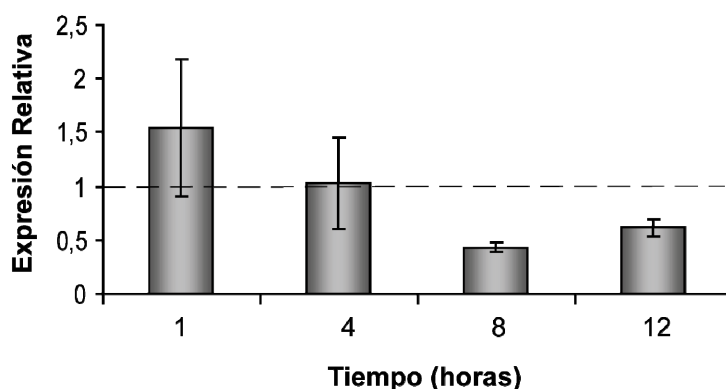


Figura 2.1. Perfil de expresión del gen SMb20651 de *S. meliloti* 1021 tras un choque salino con 400 mM de NaCl en MM. Cada dato es la media de al menos 2 réplicas biológicas independientes y las barras asociadas representan el error estándar.

Por tanto, la técnica de RT-PCR permitió verificar que un choque osmótico provoca cambios en la expresión del 64% de los genes seleccionados a partir del análisis transcriptómico de *S. meliloti* 1021 (Domínguez-Ferreras., 2006).

2. PAPEL DE LOS GENES SMb20249 y *rpoE5* EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO.

Entre los genes osmorregulados, se observó la elevada inducción y expresión del gen SMb20249 tras la adición de altas concentraciones de NaCl. Este gen codifica una hipotética proteína similar en tamaño y secuencia aminoacídica a *mio*-inositol-1-fosfato sintasas (MIPS) de bacterias. Asimismo se observó una elevada inducción de SMb21484, que codifica para un factor de transcripción σ^E (RpoE5) de función extracitoplásmica (ECF), que se caracteriza por regular la expresión de genes en respuesta a estímulos detectados a nivel de la envoltura celular. Dada la alta inducibilidad por choque osmótico y su posible papel en respuesta a estrés, ambos genes fueron sujetos a un estudio genético más detallado.

2.1. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN SMb20249 (*ino1*) DE *S. meliloti* 1021.

El gen SMb20249 se encuentra localizado en el plásmido pSymB y codifica una proteína de 367 aminoácidos, anotada como una hipotética proteína muy similar en tamaño y secuencia a *mio*-inositol-1-fosfato sintasas de bacterias.

El inositol es un poliol que se considera un metabolito esencial en muchos organismos eucariotas, aunque raramente ha sido identificado en procariotas. Entre los organismos en los que se han identificado el inositol y sus derivados, destacan algunas arqueobacterias, bacterias termófilas e hipertermófilas y bacterias gram positivas de los géneros *Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*. Este compuesto actúa como precursor de importantes metabolitos celulares implicados en diversas funciones celulares, como es la protección frente a estreses de tipo osmótico, térmico u oxidativo, mantenimiento del balance redox, biogénesis de membranas y regulación del crecimiento. Se ha descrito que también actúa como mensajero secundario en rutas de transducción de señales en organismos eucariotas (Culbertson y Henry, 1975; Majumder *et al.*, 2003).

La biosíntesis del inositol ocurre en dos pasos (Figura II.2): el primero consiste en la conversión de glucosa 6-fosfato a 1-L-*mio*-inositol-1-fosfato, reacción catalizada por la 1-L-*mio*-inositol-1-fosfato sintasa (MIPS, EC 5.5.1.4) que implica tres reacciones

consecutivas; una oxidación, una ciclación aldólica intramolecular y finalmente una reducción (dependiente de NAD^+) hasta dar lugar a la molécula 1-L-*mio*-inositol-1-fosfato. El segundo paso consiste en una defosforilación para formar finalmente el inositol a través de la 1-L-*mio*-inositol-1-fosfato fosfatasa (MIPP, EC 3.1.3.25) (Chen y Charalampous, 1964; Chen y Charalampous, 1965; Majumder *et al.*, 1997).

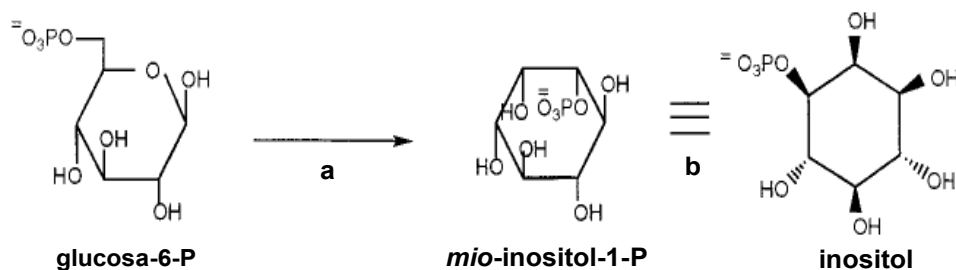


Figura 2.2. Ruta de síntesis del inositol.

a; Reacción catalizada por MIPS. b; Reacción catalizada por MIPP.

(Martin *et al.*, 1999).

El gen que codifica para MIPS se ha denominado INO1 (*ino1* en procariontas) y el primer organismo en el que se identificó, clonó y determinó su secuencia nucleotídica fue *Saccharomyces cerevisiae*, en el que resulta ser esencial en ausencia de inositol exógeno (Culbertson y Henry, 1975). También se demostró recientemente que el gen *ino1* puede ser esencial para el crecimiento y virulencia de bacterias como *M. tuberculosis* (Movahedzadeh *et al.*, 2004).

Cerca de 60 genes INO1 (*ino1*) han sido identificados tanto en procariontas como eucariotas. Si se analizan las secuencias protéicas de MIPS, se observa que en organismos eucariotas es considerada una proteína altamente conservada, mientras que en procariontas, las MIPS pueden ser muy divergentes entre sí (Majumder *et al.*, 2003). La MIPS de arqueas como *Archaeoglobus fulgidus* es una aldolasa de tipo II que requiere iones divalentes como Zn^{2+} y Mn^{2+} , mientras que la MIPS de algunos eucariotas como *S. cerevisiae* necesitan iones monovalentes de tipo NH_4^+ . Su inhibidor catalítico es el 2-deoxi-glucitol-6-fosfato (dgtOP), un compuesto que adquiere gran importancia durante el proceso de cristalización de la enzima (Stein y Geiger, 2002).

La acumulación de solutos compatibles es un requisito fundamental para el ajuste osmótico de todos los microorganismos. Las bacterias termófilas e

hipertermófilas, así como muchas arqueas que viven en ambientes extremos, mayoritariamente acumulan compuestos orgánicos inusuales (Santos y da Costa, 2002). Entre estos solutos compatibles destacan el di-*mio*-inositol fosfato, di-glicerol fosfato, manosilglicerato y el manosilglicerámido. A diferencia de los organismos mesófilos, muchas de las rutas que llevan a la acumulación de estos compuestos en situaciones de estrés (bien por síntesis “de novo” o por transporte desde el medio externo) son desconocidas. Además, se consideran únicos y exclusivos y su papel principal se basa en proteger a la célula de la desnaturalización térmica de macromoléculas (Roberts, 2000).

En arqueas como *Methanococcus igneus*, *Pyrococcus woisei*, *Pyrococcus furiosus* y algunas eubacterias como *Thermotoga maritima* existe gran acumulación intracelular de di-*mio*-inositol-1-1'-fosfato (DIP) por síntesis *de novo* como consecuencia de un choque hiperosmótico (con NaCl) y a temperaturas supraóptimas. Este soluto de bajo peso molecular tiene una función asociada a la termoprotección y la primera enzima que interviene en su ruta biosintética es la MIPS (Martins y Santos, 1995; Martins *et al.*, 1997).

2.1.1. Análisis “in silico” del gen SMb20249 implicado en la síntesis del inositol y compuestos derivados en *S. meliloti* 1021.

La proteína codificada por este gen de *S. meliloti* presenta una identidad del 60-70% con la secuencia de MIPS de bacterias de los géneros *Chloroflexus* y *Roseiflexus*, con *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 y bacterias gram positivas de los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Streptomyces* (Tabla 2.3). A partir de ahora, denominaremos al gen SMb20249 como *ino1* debido a la elevada similitud que presenta la secuencia aminoácidica de su producto con enzimas MIPS de bacterias. Existen también posibles ortólogos de *ino1* en algunos rizobios como *S. medicae* WSM419, *Rhizobium etli* CFN42, *Mesorhizobium* sp. BNC1 y *Bradyrhizobium* sp. ORS278. En algunos casos como *R. etli* CFN42, existe además una conservación del entorno génico de SMb20249 (Figura 2.3). Por otro lado, en el genoma de *S. meliloti* no parecen existir otras posibles proteínas con homología a MIPS. Sin embargo, en el genoma de esta bacteria han sido anotadas 8 posibles inositol fosfato fosfatasas, 4 localizadas en el cromosoma y las otras 4 en el plásmido pSymB.

Tabla 2.3. Comparación de la secuencia del producto de SMb20249 de *S. meliloti* 1021 con proteínas de otras bacterias.

Organismo	Anotación del gen	Tamaño (aa) [#]	Identidad
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	SMb20249	367	100 %
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_3883	367	96 %
<i>R. etli</i> CFN 42	RHE_CH02739	367	79 %
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	Meso_2694	571	73 %
<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941	Rcas_1160	356	70 %
<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	CaggDRAFT_3636	361	69 %
<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1	RoseRS_0382	356	70 %
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl	Caur_1572	361	69 %
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	MnodDRAFT_5570	362	72 %
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO2076	371	72 %
<i>Corynebacterium efficiens</i> YS	CE2831	359	66 %
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	MAV_0067	362	63 %
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>ino1</i>	363	64 %

[#] Tamaño de la secuencia aminoacídica (aa) correspondiente a cada proteína.

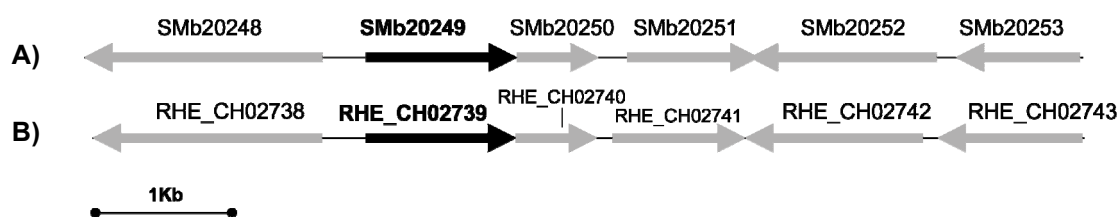


Figura 2.3. Representación de la región genética de *ino1* en rizobios. **A**; *Sinorhizobium meliloti* 1021, **B**; *Rhizobium etli* CFN 42.

Con estos antecedentes, se planteó investigar el papel de *ino1* en la adaptación a estrés de *S. meliloti* 1021, para lo que se procedió inicialmente a la obtención de un mutante en dicho gen. El proceso para la obtención de este mutante (*ino1*⁻) está descrito en el anexo 1 de este capítulo.

2.1.2. Capacidad de adaptación a estrés osmótico y térmico en vida libre de un mutante *ino1* de *S. meliloti* 1021.

Estudios anteriores en nuestro laboratorio con *S. meliloti* 1021 permitieron establecer las concentraciones adecuadas de NaCl y sacarosa (tanto en medio rico TY como medio mínimo MM) para estudiar el crecimiento y la capacidad de osmoadaptación de los mutantes derivados de esta cepa.

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento del mutante *ino1* en medio mínimo adicionado de 300 mM o 400 mM de NaCl y 700 mM de sacarosa desde el inicio del cultivo. Estas curvas se realizaron en tubos de 3 ml inoculados con 10^7 - 5×10^7 ufc y se estudió el crecimiento midiendo la DO_{600nm} durante 40-70 horas (Figura 2.4).

Por otro lado, se hicieron curvas de choque salino, mediante la adición de distintas concentraciones de NaCl cuando los cultivos habían alcanzado una DO_{600nm} de 0,4 (Figura 2.5). Además, se estudió el crecimiento del mutante *ino1* a temperatura supraóptima (37°C; Figura 2.6). En todos los casos y como referencia, se realizaron cultivos paralelos de la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 en las mismas condiciones.

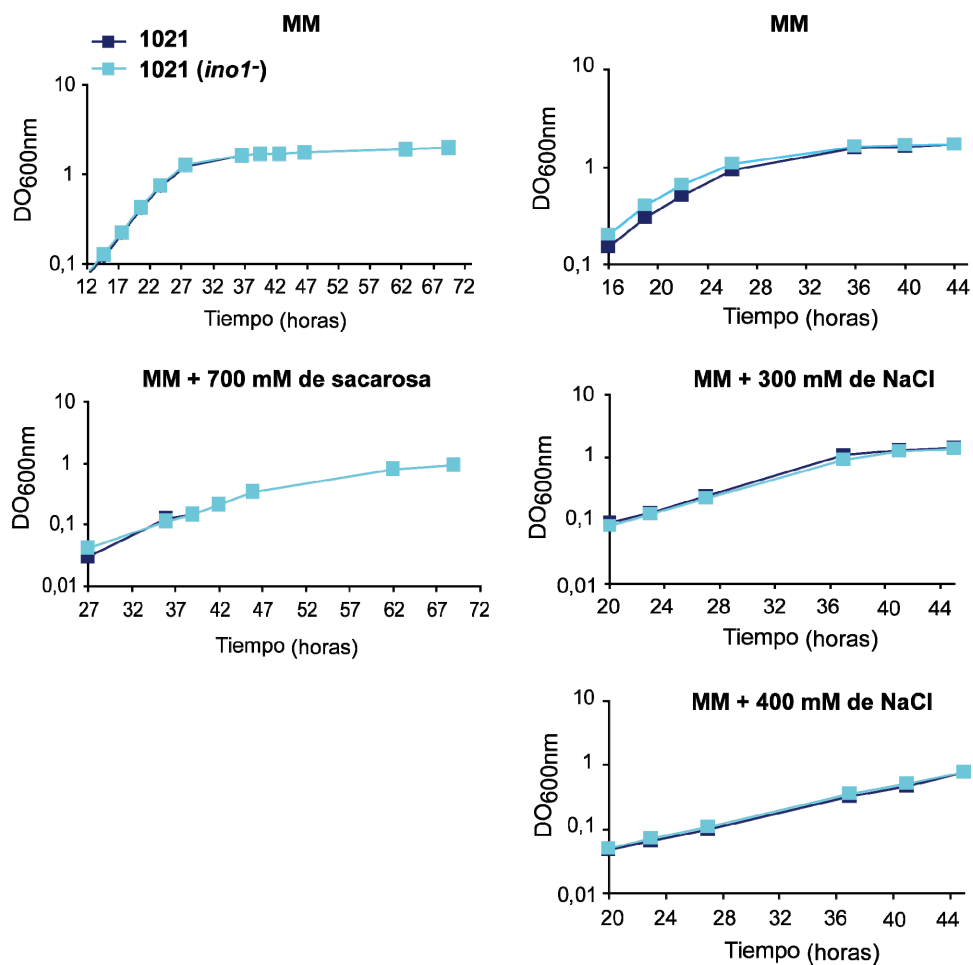


Figura 2.4. Curvas de crecimiento de un mutante *ino1* de *S. meliloti* en MM adicionado de 700 mM de sacarosa, 300 mM y 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo. En cada gráfica se incluye como control el crecimiento de *S. meliloti* 1021.

Como puede observarse el crecimiento del mutante *ino1* no presentó diferencias significativas con respecto a la cepa parental en ninguna de las condiciones ensayadas. Estos resultados sugieren que este gen no es necesario para la adaptación de *S. meliloti* a estrés osmótico y térmico.

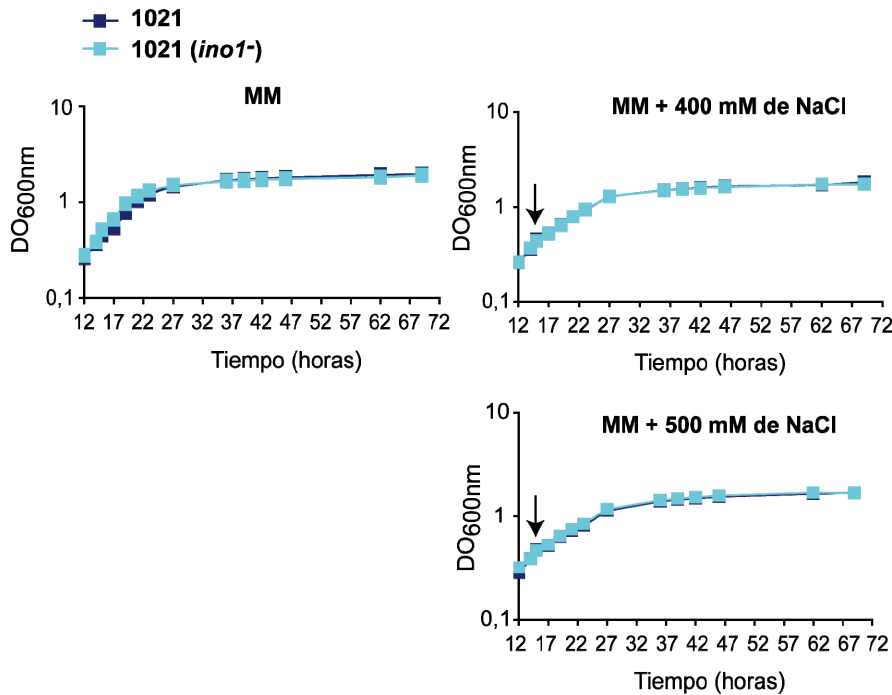


Figura 2.5. Curvas de crecimiento de un mutante en el gen *ino1* de *S. meliloti* 1021 tras un choque salino en medio mínimo (MM). Se adicionó NaCl durante la fase logarítmica (en el punto indicado por la flecha). En cada gráfica se incluye también la curva correspondiente a la cepa silvestre *S. meliloti* 1021.

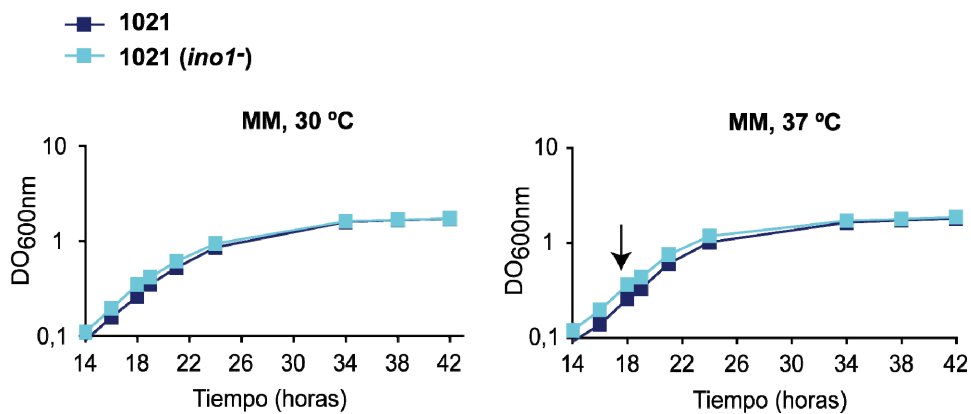


Figura 2.6. Curvas de crecimiento de un mutante *ino1* de *S. meliloti* 1021 en MM y a temperatura supraóptima (37°C). Crecimiento a 37°C a partir del punto indicado por la flecha. En cada gráfica se incluye como control el crecimiento de *S. meliloti* 1021.

2.1.3. Importancia del gen *ino1* de *S. meliloti* 1021 en la simbiosis con *Medicago sativa* (alfalfa).

Se determinó la infectividad de un mutante *ino1* de *S. meliloti* en raíces de alfalfa. El mutante *ino1* mostró una capacidad de nodulación similar a la cepa silvestre (Figura 2.7). Por su apariencia y la de la parte aérea de las plantas, dichos nódulos se pueden considerar normales en su desarrollo y funcionalidad.

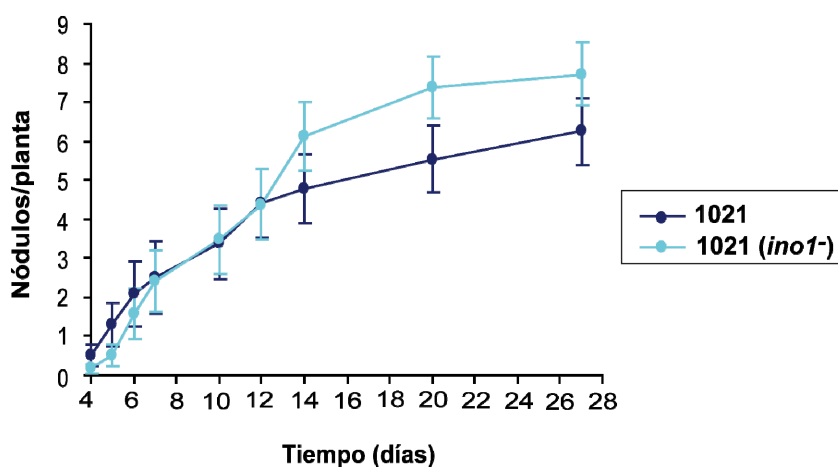


Figura 2.7. Cinética de nodulación del mutante *ino1* en raíces de *Medicago sativa*, en comparación con la cepa parental *S. meliloti* 1021. Cada punto es la media de 24 plantas y las barras asociadas corresponden al error estándar.

2.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN *rpoE5* DE *S. meliloti* 1021.

2.2.1. Análisis “in silico” del gen *rpoE5* de *S. meliloti* 1021.

La secuencia del genoma de *S. meliloti* 1021, según la base de datos de la página <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/rhime/>, revela la presencia de 14 genes que codifican posibles factores sigma de la ARN polimerasa. Entre estos, aparecen anotadas 6 copias del gen *rpoE*, además de tres genes que podrían codificar 3 factores sigma de función extracitoplásmica adicionales (ECF). 4 de las copias *rpoE*, *rpoE1*, *rpoE2*, *rpoE3* y *rpoE4*, se localizan en el cromosoma y las otras 2, *rpoE6* y *rpoE5*, se encuentran en los plásmidos pSymA y pSymB, respectivamente (Figura 2.8). En los experimentos de microarrays realizados en *S. meliloti* (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006) se observó la inducción de *rpoE2* y *rpoE5* y

la represión del gen *rpoE4* tras un choque salino. Debido a la temprana inducción del gen *rpoE5* tras un choque osmótico, resultaba plausible que la proteína codificada por este gen estuviese implicada en la regulación de la respuesta a estrés general.

El gen *rpoE5* codifica una proteína de 173 aminoácidos que presenta homologías del 52%, 46% y 48% con proteínas de *Rhodobacter sphaeroides* (RSP_2681), *Bradyrhizobium japonicum* (blr7797) y *M. loti* (mll3697), respectivamente.

Como ocurre en *S. meliloti*, algunas especies de rizobios poseen también varias copias del gen *rpoE*. Tal es el caso de *M. loti*, *R. etli*, *R. leguminosarum* y *A. tumefaciens* que junto con otras α -proteobacterias contienen anotados en sus genomas múltiples copias del gen que codifica para el factor sigma de función extracitoplásmica.

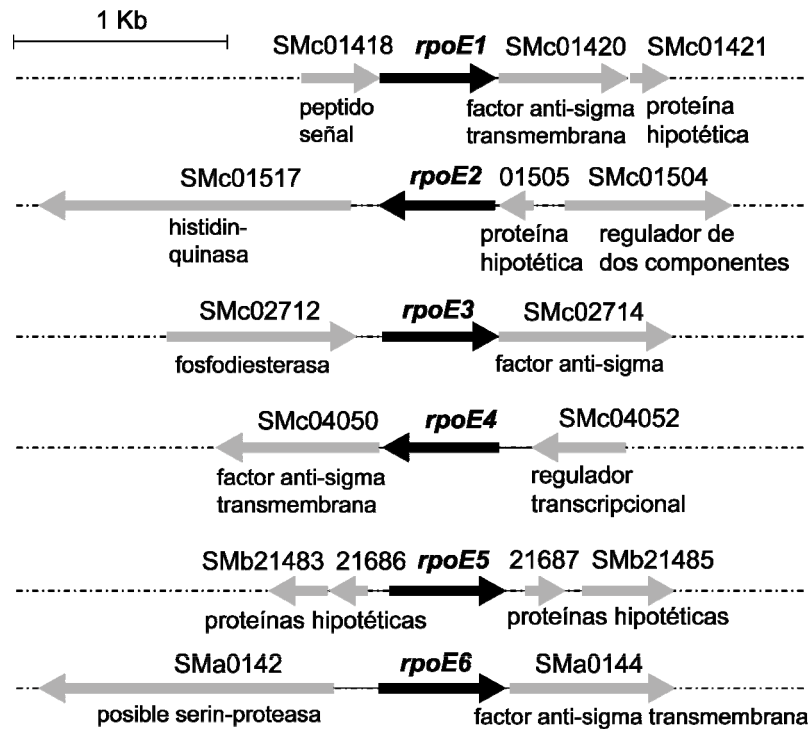


Figura 2.8. Esquema de la localización de genes *rpoE* en el genoma de *S. meliloti* 1021. En la parte superior de las flechas está señalada la anotación de cada gen, mientras que en la parte inferior se muestra la posible proteína codificada por cada uno de ellos, según la anotación del genoma de *S. meliloti* 1021 (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/rhime/>).

2.2.2. Capacidad de adaptación a estrés osmótico y térmico de un mutante *rpoE5* de *S. meliloti* 1021.

Para estudiar la capacidad de crecimiento del mutante *rpoE5* de *S. meliloti* 1021, se realizaron curvas en medios con distintas concentraciones de NaCl y a temperaturas diferentes de la misma manera que para el estudio del mutante en el gen *ino1* (Figuras 2.9, 2.10 y 2.11).

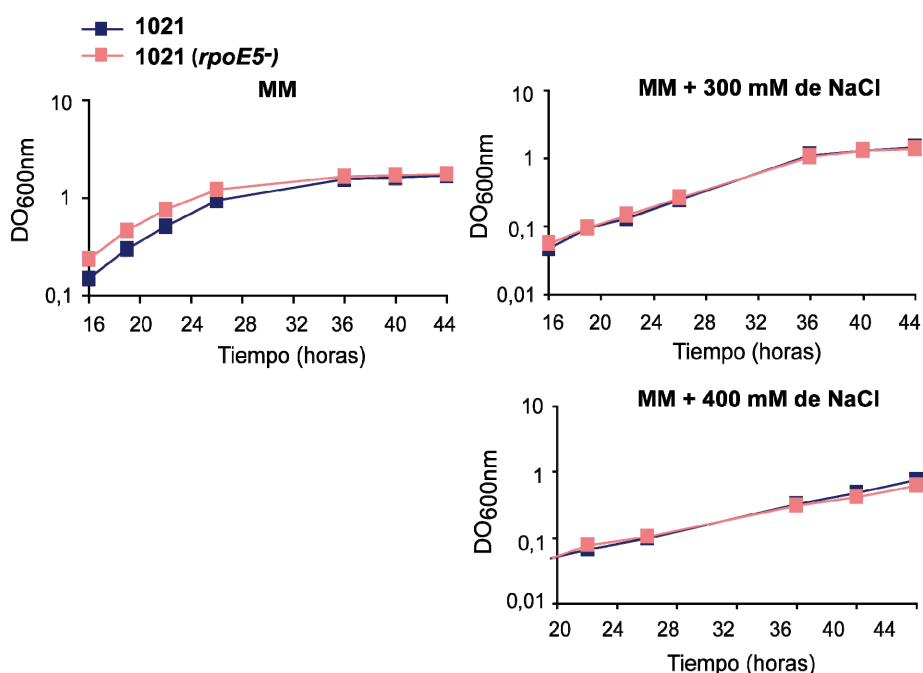


Figura 2.9. Curvas de crecimiento de un mutante *rpoE5* de *S. meliloti* en MM adicionado de 300 mM y 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo. En cada gráfica se incluye como control el crecimiento de *S. meliloti* 1021.

Como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento del mutante *rpoE5* con respecto a su cepa parental en ninguna de las condiciones ensayadas. Estos resultados indicaban que este gen no es necesario para la adaptación de *S. meliloti* a estrés osmótico y térmico.

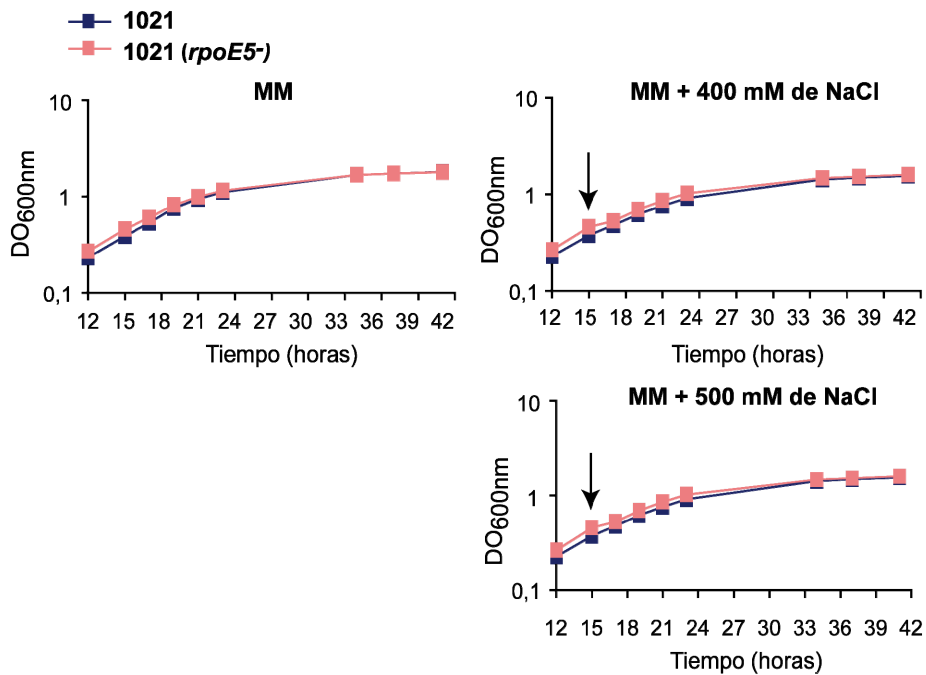


Figura 2.10. Curvas de crecimiento de un mutante en el gen *rpoE5* de *S. meliloti* 1021 tras un choque salino en medio mínimo (MM). Se adicionó NaCl durante la fase logarítmica (en el momento indicado por la flecha). En cada gráfica se incluye como control el crecimiento de *S. meliloti* 1021.

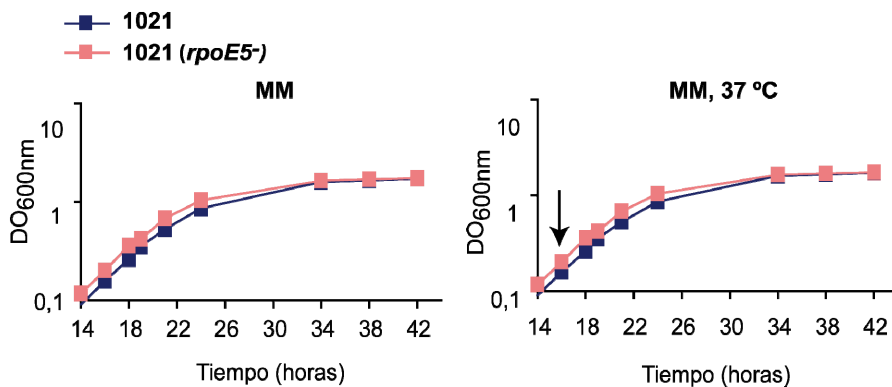


Figura 2.11. Curvas de crecimiento de un mutante *rpoE5* de *S. meliloti* 1021 a 30°C y a temperatura supraóptima (37°C) a partir del momento indicado por la flecha. En cada gráfica se incluye como control el crecimiento de *S. meliloti* 1021.

2.2.3. Importancia del gen *rpoE5* DE *S. meliloti* 1021 en la simbiosis con *Medicago sativa*.

Como se ha descrito en el apartado anterior, una mutación en el gen *rpoE5* de *S. meliloti* 1021 no alteraba la capacidad de adaptación de la bacteria en condiciones de estrés osmótico y térmico. Aunque no se vió ninguna diferencia en vida libre, se realizó una cinética de nodulación con este mutante para determinar si *rpoE5* podía estar directamente implicado en la simbiosis con plantas de alfalfa. Como semuestra en la figura 2.12, los ensayos de infectividad no mostraron diferencias significativas entre el mutante *rpoE5* y la cepa parental *S. meliloti* 1021.

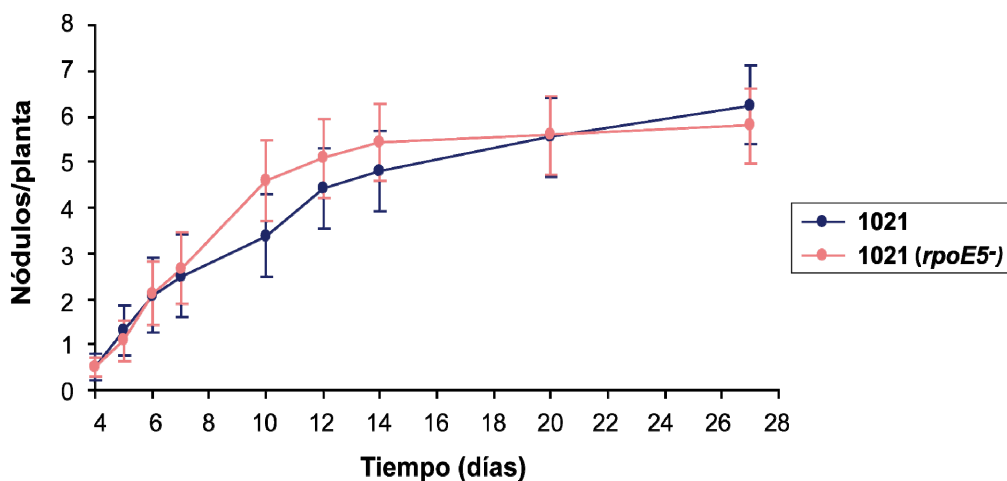


Figura 2.12. Cinética de nodulación del mutante *rpoE5* en raíces de *Medicago sativa*. Se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021. Cada punto es la media de 24 plantas y las barras asociadas corresponden al error estándar.

3. IMPLICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS SIMBIÓTICOS DE *S. meliloti* EN TOLERANCIA A ESTRÉS OSMÓTICO.

Como evidenciaron los estudios de los genes *ino1* y *rpoE5*, la inducibilidad por estrés osmótico de un gen no es per sé un dato que garantice su papel activo en el proceso osmoadaptativo de la bacteria. Se hacía por tanto necesario encontrar evidencias adicionales para abordar con ciertas garantías de éxito los estudios genéticos dirigidos a la identificación de nuevos genes de osmoadaptación en esta

bacteria. En este sentido, se valoraron otros datos surgidos del estudio transcriptómico realizado por Domínguez-Ferreras y colaboradores (2006).

Cuando se analizó la distribución por replicones de los genes osmorregulados en dicho estudio, se observó la existencia de un sesgo bastante llamativo: la mayoría de los genes reprimidos (un 85%) aparecieron localizados en el cromosoma, mientras que la mayoría (64%) de los genes inducidos se localizaban en alguno de los plásmidos simbióticos (pSyms) y de forma muy significativa en el plásmido pSymB (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006; Figura 2.13). En este plásmido se identificaron un total de 270 genes osmorregulados, el 83 % de los cuales estaban aparentemente inducidos. Estos resultados indicaban que en los plásmidos simbióticos, y particularmente en el pSymB, podrían acumularse una serie de genes potencialmente importantes para la osmoadaptación de esta bacteria. Por ello, se decidió realizar un estudio genético dirigido a determinar la importancia de estos plásmidos simbióticos para la capacidad osmoadaptativa de *S. meliloti* 1021.

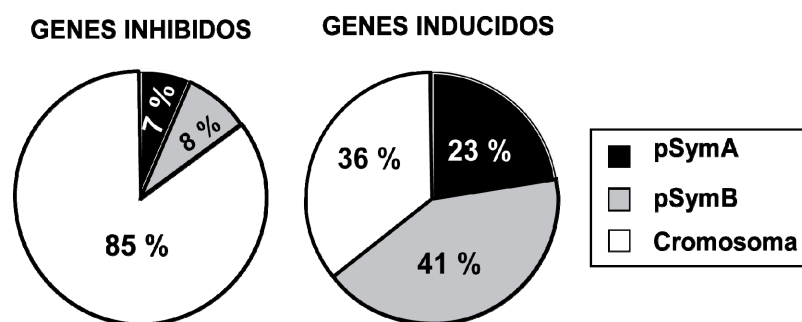


Figura 2.13. Distribución en replicones (pSymA, pSymB y cromosoma) de genes osmorregulados de *S. meliloti* 1021. Figura modificada de Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006.

3.1. CAPACIDAD DE OSMOADAPTACIÓN EN VIDA LIBRE DE UNA CEPA DE *S. meliloti* CURADA DEL PLÁSMIDO pSymA.

Para conocer la importancia del plásmido pSymA de *S. meliloti* en la tolerancia a estrés, se estudió la capacidad de crecimiento de la cepa A818, curada del plásmido pSymA (Oresnik *et al.*, 2000), en medio mínimo (MM) y medio rico (TY) adicionado de distintas concentraciones de NaCl y sacarosa. Se realizaron curvas de crecimiento en tubos de 3 ml de cultivo que se inocularon con 5×10^7 ufc. A continuación, se midió el crecimiento en función de la DO_{600nm} durante 35-50 horas (Figura 2.14).

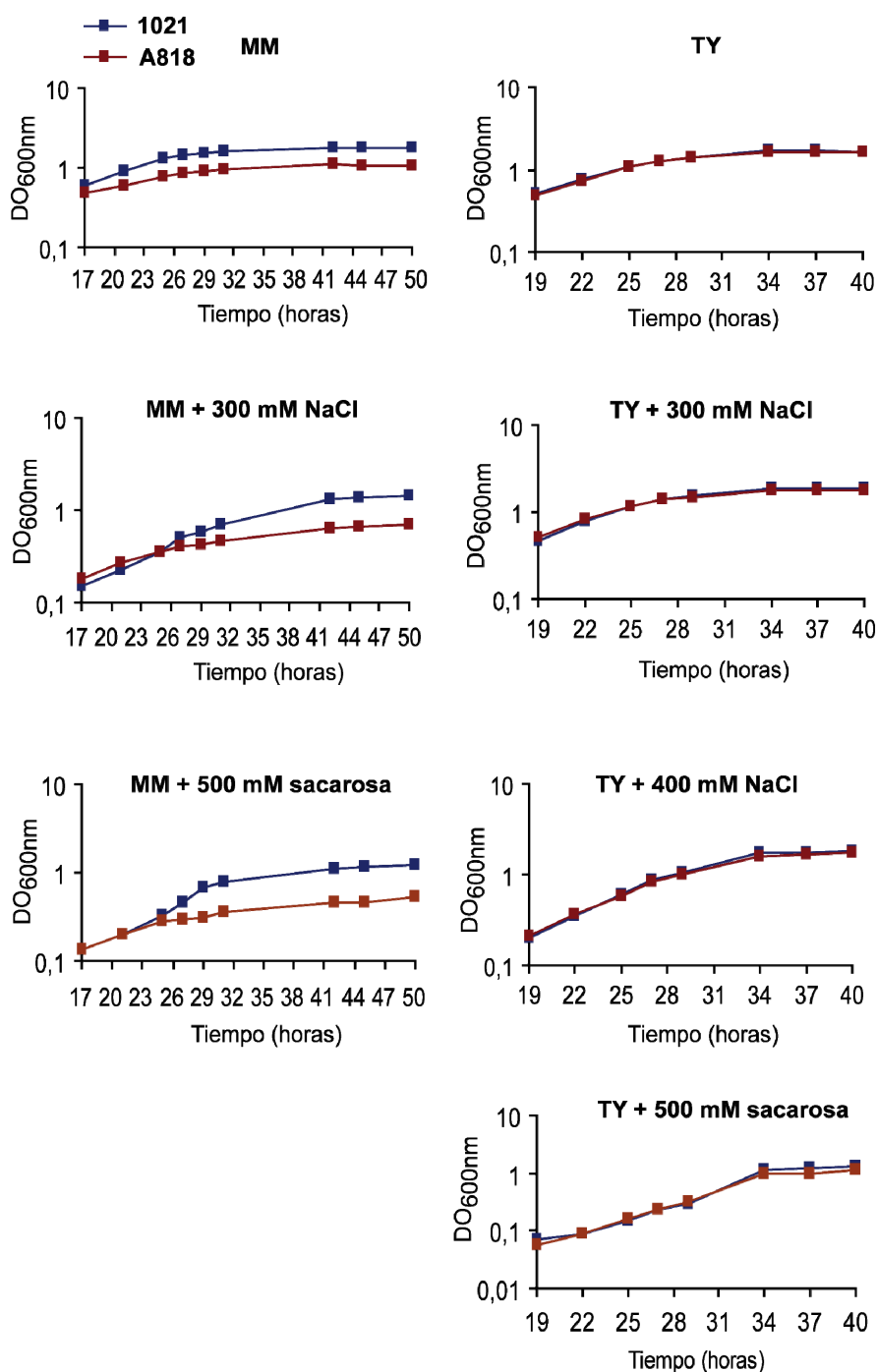


Figura 2.14. Curvas de crecimiento de la cepa A818 de *S. meliloti* en MM (A) y en TY (B) adicionados de distintas concentraciones de NaCl y sacarosa desde el inicio del cultivo. Se incluyen como referencia las curvas de MM y TY sin NaCl añadido.

Los resultados mostraron un retraso notable en el crecimiento en MM de la cepa A818 con respecto a la cepa silvestre 1021. Por tanto, no pudo determinarse si pSymA está implicado en la capacidad de osmoadaptación de la bacteria en este

medio de crecimiento. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el crecimiento en medio TY en ninguna de las condiciones ensayadas. Estos datos sugieren que el plásmido pSymA no es importante para la adaptación de *S. meliloti* a estrés osmótico.

3.2. IMPORTANCIA DEL pSymB PARA LA OSMOADAPTACIÓN DE *S. meliloti* 1021.

Al contrario que pSymA, el plásmido pSymB (1,68 Mb) de *S. meliloti* es esencial para esta bacteria, por lo que no es posible obtener cepas carentes del mismo. No obstante, fue posible obtener cepas que, sin estar curadas de este plásmido, poseen versiones delecionadas del mismo. Así, para este estudio inicial se hizo uso de una colección de mutantes derivados de 1021, cada una de las cuales tenía delecionada una región diferente del pSymB (Charles y Finan, 1991).

Se seleccionaron un total de 11 cepas de forma que la suma de las deleciones de cada una de ellas cubriese el plásmido entero (Figura 2.15) y se estudió la capacidad de crecimiento de cada una de estas cepas en medios con alta osmolaridad (NaCl y sacarosa).

La capacidad de crecimiento de cada cepa se determinó mediante la obtención de las correspondientes curvas de crecimiento en MM o TY, en ausencia y presencia de altas concentraciones de sal o sacarosa.

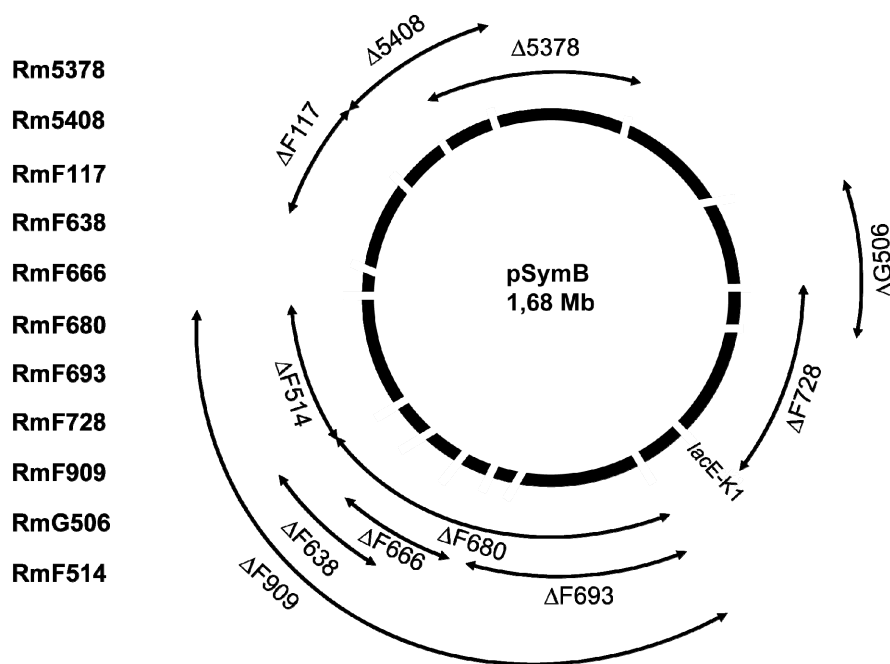


Figura 2.15. Representación de diferentes versiones delecionadas del plásmido pSymB presentes en varias cepas derivadas de *S. meliloti* 1021. Las flechas indican la región delecionada en cada cepa. Figura modificada de Charles y Finan, 1991.

Algunas de estas cepas, como RmF638 y Rm5408, presentaron un retraso de 48 horas en el crecimiento con respecto a su cepa parental, tanto en medio mínimo como en medio rico TY con y sin antibióticos, por lo que fueron descartadas directamente para los estudios en medios de elevada osmolaridad.

Otras cepas, como Rm5378, RmG506, RmF728, RmF680, RmF666, RmF693 y RmF909 fueron estudiadas en primer lugar en medio mínimo (Figura 2.16). Se pudo observar que algunas de estas cepas, como Rm5378, RmG506, RmF728 y RmF680, presentaron un crecimiento significativamente más lento que la cepa parental *S. meliloti* 1021 en este medio, lo que dificultaba ostensiblemente el poder comparar su capacidad de adaptación con la de la cepa parental en medios hiperosmóticos. Estos resultados condujeron a descartarlas para los estudios en medios de elevada osmolaridad.

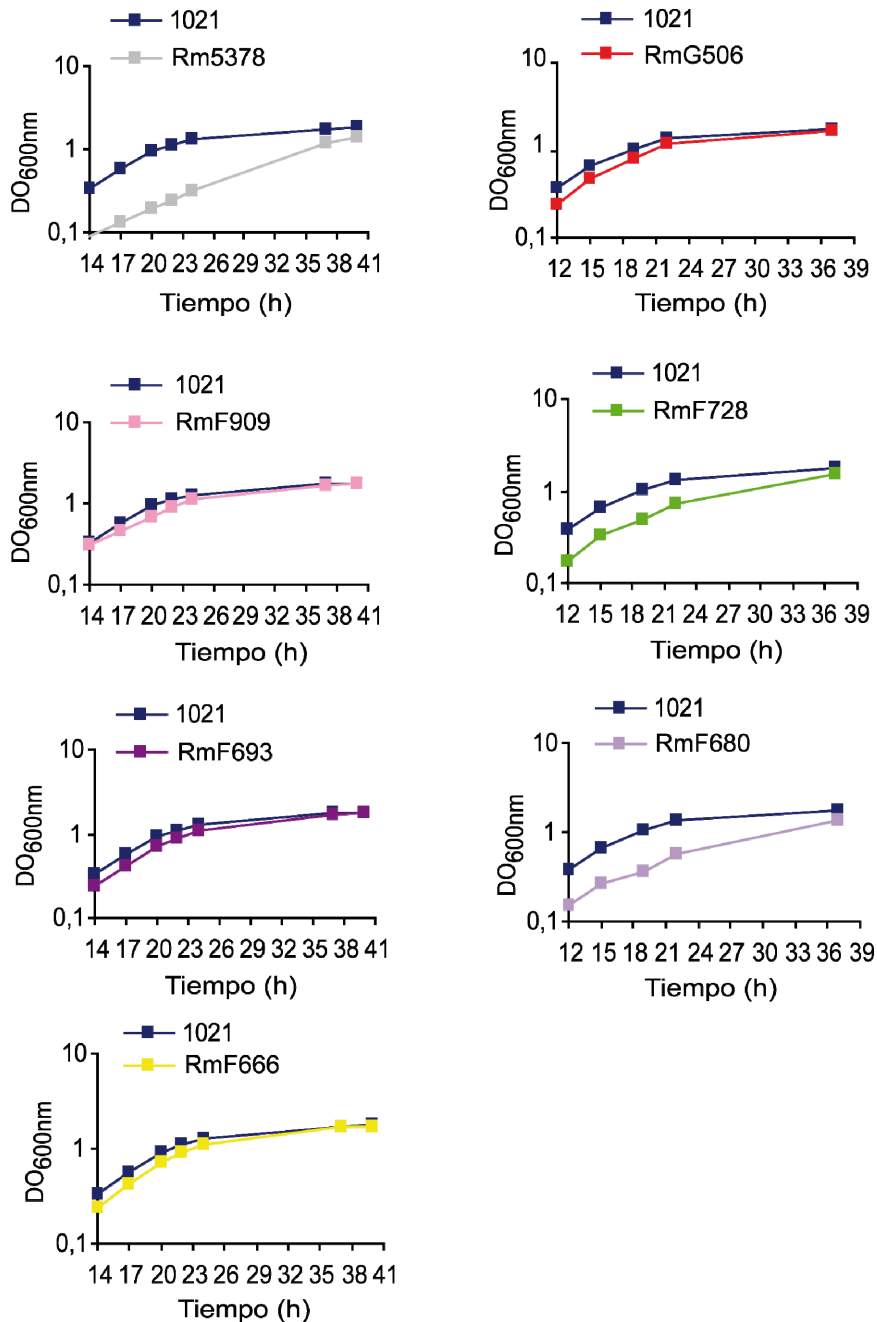


Figura 2.16. Curvas de crecimiento en medio mínimo de las cepas Rm5378, RmG506, RmF728, RmF680, RmF666, RmF693 y RmF909 derivadas de *S. meliloti* 1021. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

Respecto a las restantes cepas, el crecimiento de las cepas RmF666, RmF693, RmF909 y RmF514 fue semejante al de la cepa parental en dicho medio (Figura 2.17). Estos resultados permitieron continuar con el estudio de su capacidad de crecimiento en medios hiperosmóticos (Figuras 2.19, 20 y 21). La cepa RmF117, en cambio, presentó crecimiento retrasado en TY y fue descartada directamente. Finalmente, en

la figura 2.18 se muestra un esquema de las cepas portadoras de pSymB que pudieron ser estudiadas en medios con alta osmolaridad.

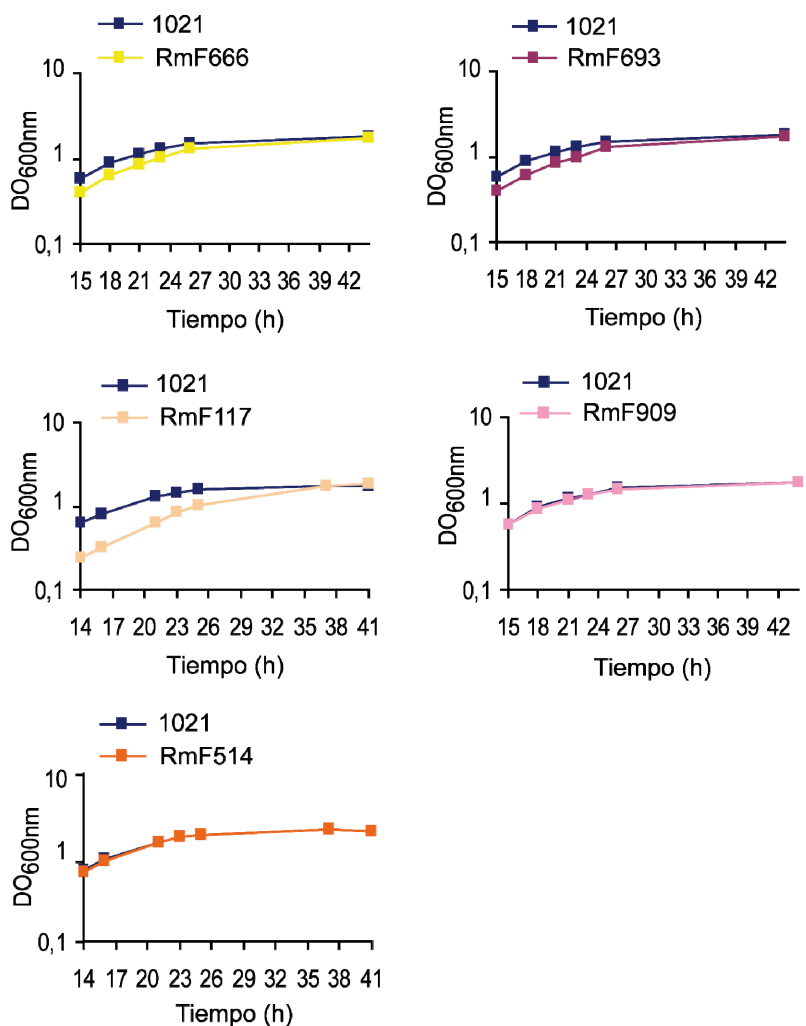


Figura 2.17. Curvas de crecimiento en medio TY de las cepas RmF666, RmF693 y RmF909, RmF514 y RmF117 en relación a la cepa parental *S. meliloti* 1021.

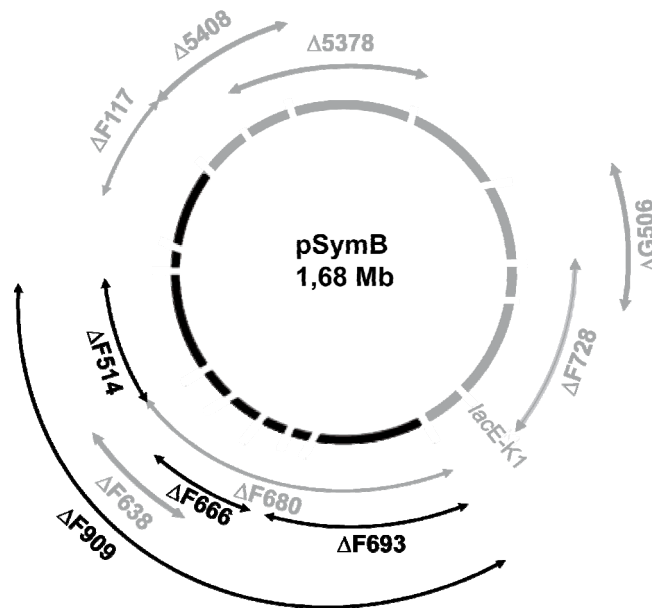


Figura 2.18. Esquema representativo de las regiones de pSymB deletcionadas en cada una de las cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 utilizadas en estudios de osmoadaptación. En negro se muestran la extensión de las delecciones en aquellas cepas mutantes que pudieron ser estudiadas en medios con alta osmolaridad. En gris, aparecen señalados aquellos cuya tasa de crecimiento fue sensiblemente inferior a la de la cepa silvestre en condiciones control.

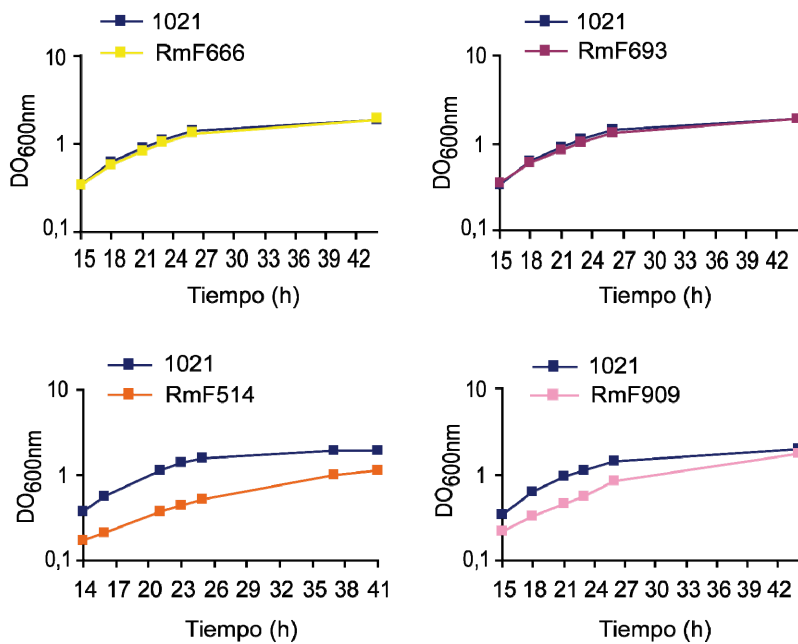


Figura 2.19. Curvas de crecimiento de las cepas RmF666, RmF693, RmF514 y RmF909 en medio TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo.

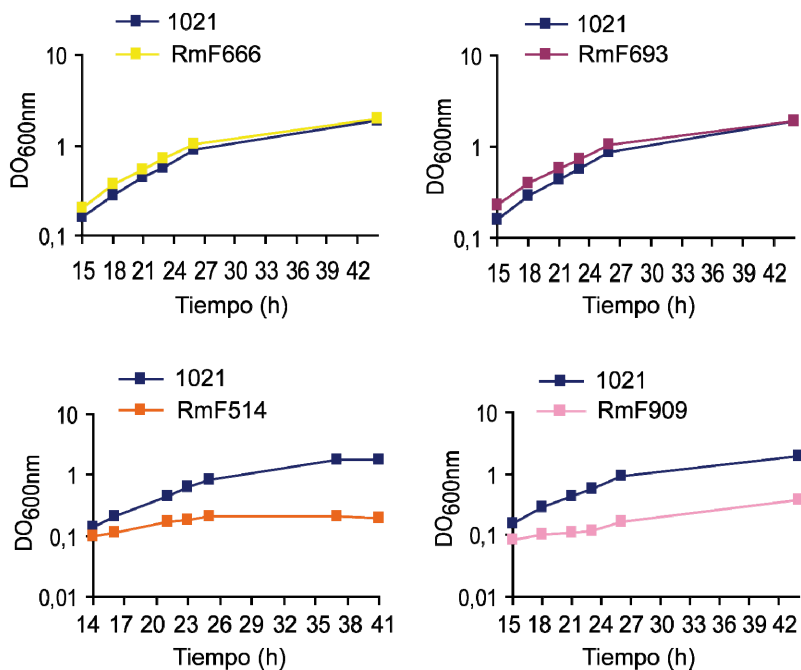


Figura 2.20. Curvas de crecimiento de las cepas RmF666, RmF693, RmF514 y RmF909 en medio TY adicionado de 500 mM de NaCl desde el inicio del cultivo.

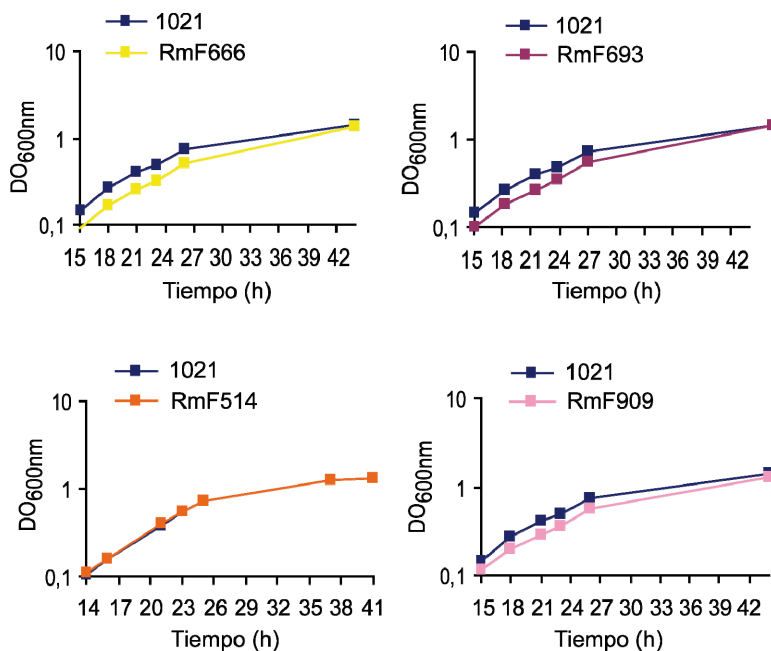


Figura 2.21. Curvas de crecimiento de las cepas RmF666, RmF693, RmF514 y RmF909 en medio TY adicionado de 700 mM de sacarosa desde el inicio del cultivo.

Las cepas RmF666, RmF693, RmF909 y RmF514 presentaron una capacidad de crecimiento en medio TY semejante a la cepa parental (Figura 2.17). Entre estos, sólo RmF909 y RmF514 mostraron crecimiento retrasado en condiciones de alta salinidad (Figuras 2.19 y 20) aunque no en 700 mM de sacarosa (Figura 2.21).

Con objeto de verificar el fenotipo mostrado por las cepas RmF514 y Rm909 se realizaron nuevas curvas de crecimiento en medio TY adicionado de 400 mM de NaCl, en matraces de 100 ml que contenían 18 ml de cultivo. Se inoculó cada matraz con aproximadamente 10^8 ufc de cada cepa y se determinó el aumento de la DO_{600nm} periódicamente durante 50 horas.

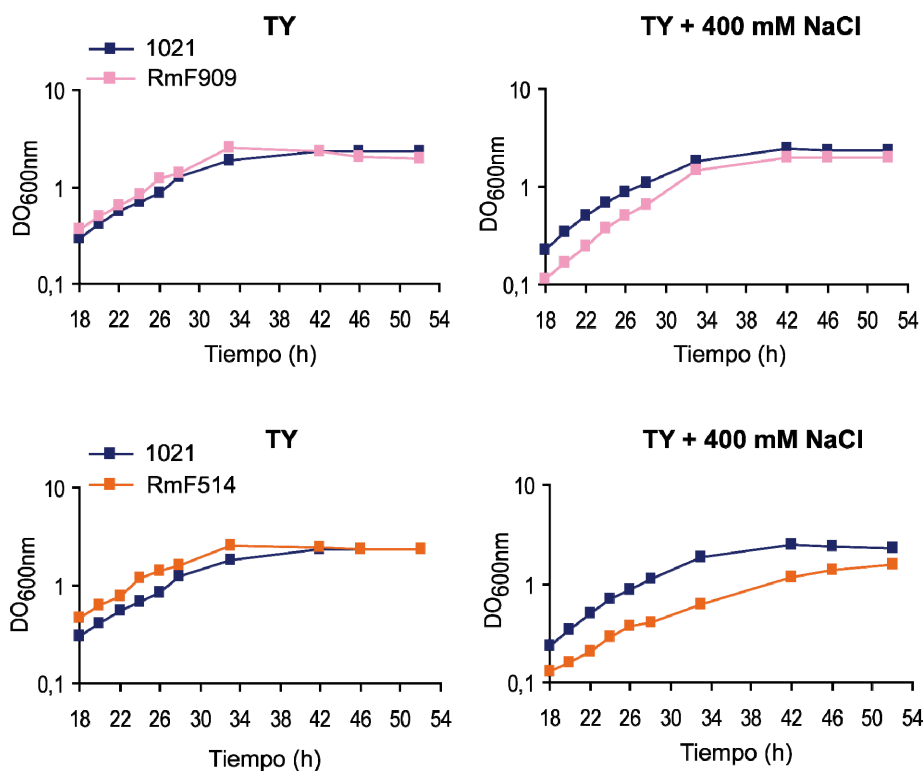


Figura 2.22. Curvas de crecimiento de las cepas RmF514 y RmF909 en medio TY y TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio de cultivo.

Como se observa en la figura 2.22, estos experimentos demostraron que ambas cepas tienen reducida su capacidad de crecimiento en medios salinos.

Asimismo, se estudió la capacidad de respuesta de ambas cepas a un cambio brusco de la salinidad del medio (choque salino). Para ello, se cultivaron las cepas en medio TY hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,4, momento en el que se añadió NaCl hasta una concentración de 500 mM, midiendo el incremento de DO de los

cultivos a lo largo del tiempo (Figura 2.23). Las curvas de choque salino mostraron una reducción de la capacidad de crecimiento de las cepas RmF909 y RmF514 con respecto a 1021 después de la adición del NaCl.

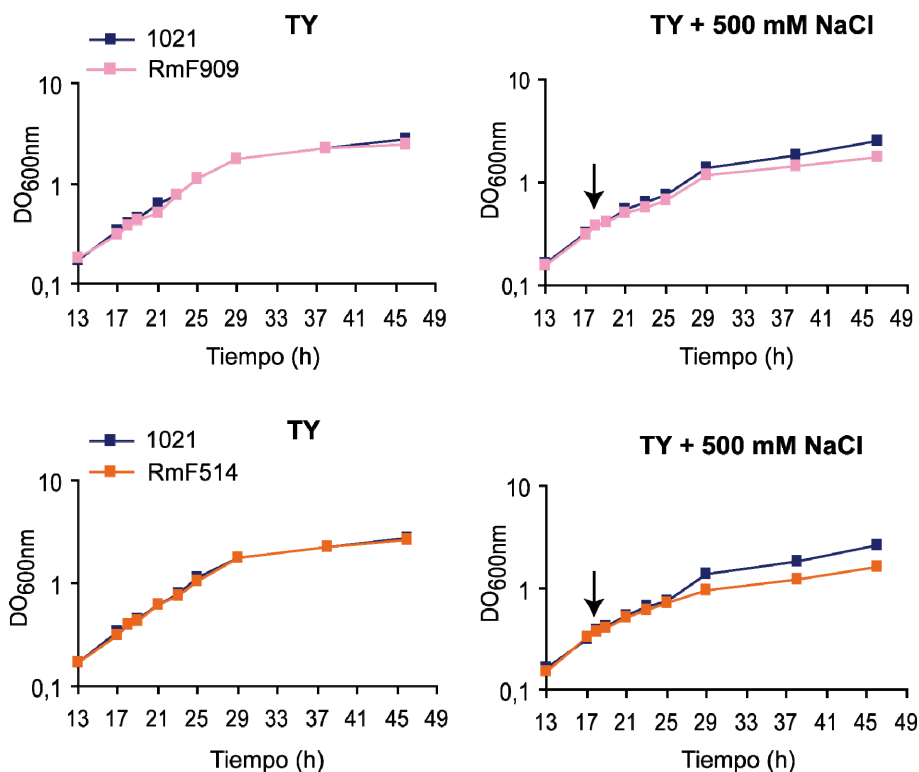


Figura 2.23. Crecimiento de las cepas RmF514 y RmF909 en respuesta a un choque salino. Las flechas indican el momento de la adición del NaCl.

Además, se determinó la capacidad de osmoadaptación de las cepas mutantes RmF514 y RmF909 sobre placas de medio TY sólido adicionado de distintas concentraciones de NaCl (400 y 500 mM) y de sacarosa (500 y 700 mM). En cada placa se compararon las cepas mutantes con la parental (1021) colocando gotas de 10 μ l de diluciones seriadas (desde 10^2 ufc hasta 10^5 ufc). Cada ensayo se realizó por duplicado y en todas la placas se incluyó la cepa parental, *S. meliloti* 1021 como referencia. Los resultados fueron similares a los obtenidos en medio líquido. En TY con 500 mM y 700 mM de sacarosa no hubo diferencias significativas en el crecimiento de las cepas RmF514 y RmF909 con respecto a su parental, mientras que ambas mostraron un crecimiento muy limitado en placas con NaCl (Figura 2.24)

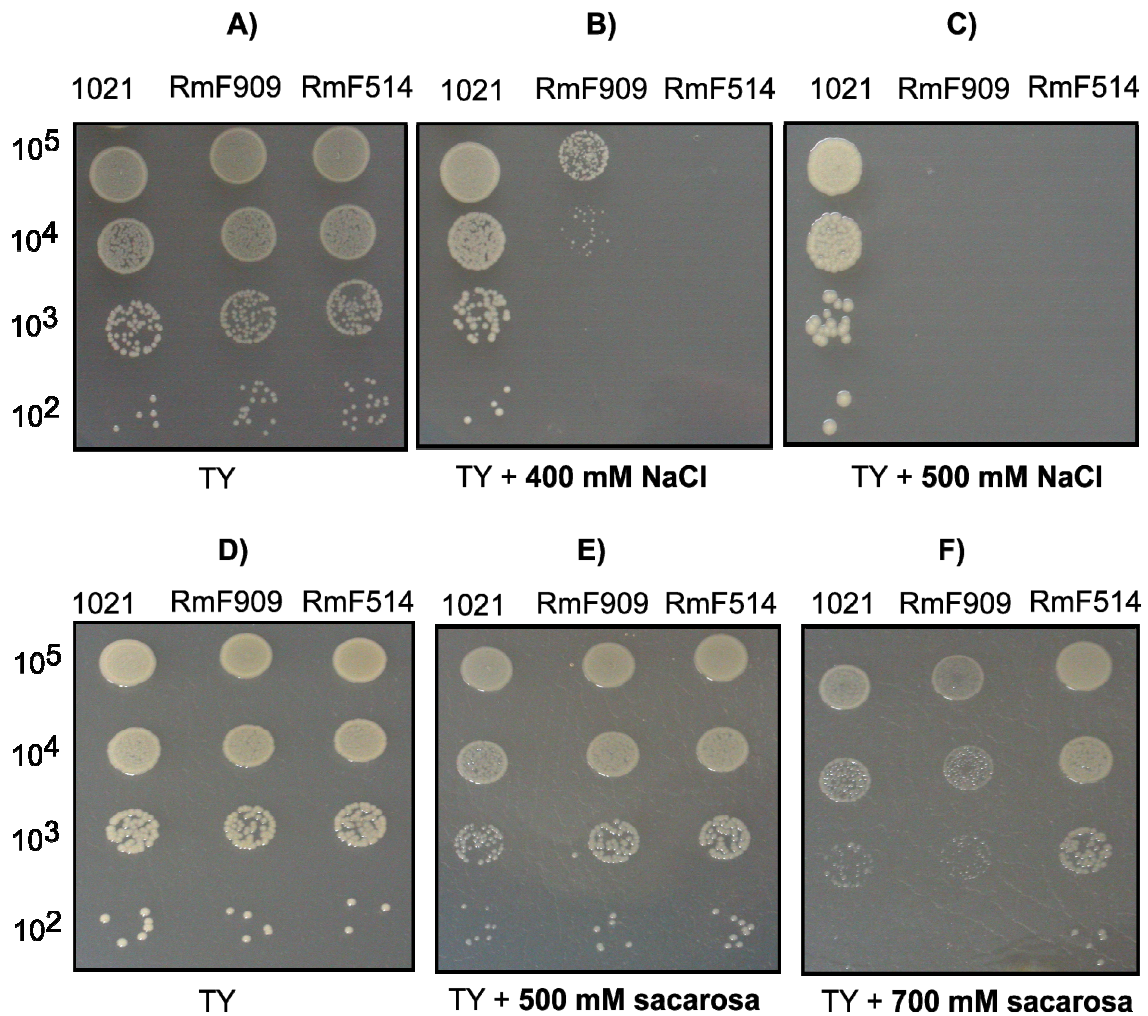


Figura 2.24. Crecimiento de las cepas RmF514 y RmF909 en medio sólido TY adicionado de 400 mM (B) y 500 mM de NaCl (C) y 500mM (D) y 700 mM de sacarosa (F). En cada ensayo se incluye la cepa parental *S. meliloti* 1021 como referencia.

Como puede observarse en la figura 2.25, las cepas RmF514 y RmF909 presentan deleciones del pSymB solapantes en unas 200 Kb, lo que sugería que esta región del pSymB podía contener genes importantes para el crecimiento de *S. meliloti* 1021 en medios salinos. Curiosamente, las deficiencias en el crecimiento de la cepa RmF514 en estas condiciones fueron mayores que la cepa RmF909, a pesar de presentar una deleción del pSymB de menor tamaño (Figuras 2.22B, 23B y 24B).

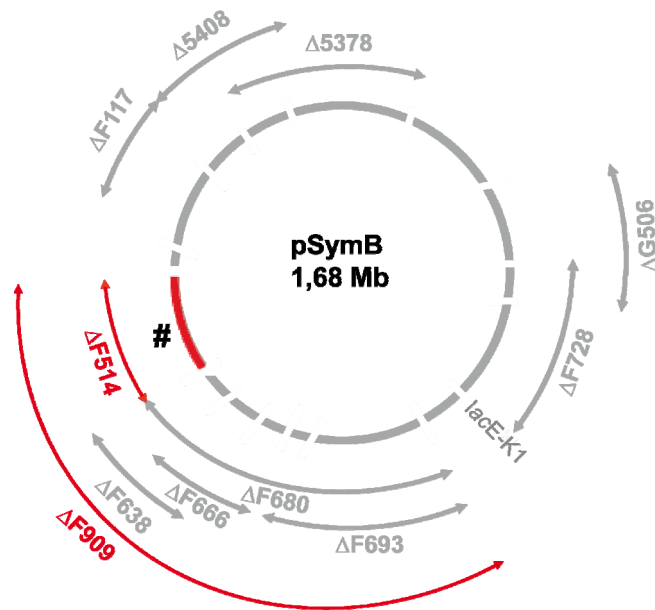


Figura 2.25. Esquema representativo de las regiones de pSymB faltantes en las cepas RmF514 y RmF909. # Región de 200 Kb importante para la adaptación a estrés salino.

3.3. INFECTIVIDAD DE LAS CEPAS RmF514 Y RmF909 EN RAICES DE *Medicago sativa*.

Las plantas de alfalfa se inocularon con 10^6 ufc/ml. La capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno se determinó mediante la obtención de las correspondientes cinéticas de nodulación en raíces de alfalfa.

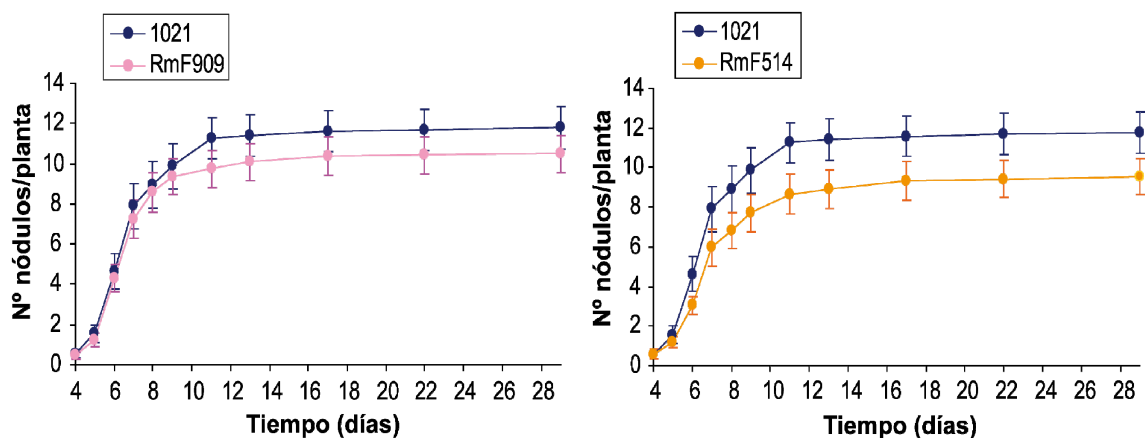


Figura 2.26. Cinéticas de nodulación de las cepas RmF909 y RmF514. En cada gráfica se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021. Cada punto es la media de 24 plantas y las barras asociadas corresponden al error estándar.

Ambas cepas mutantes mostraron una tendencia a formar menos nódulos que la cepa parental *S. meliloti* 1021, si bien las diferencias no fueron consideradas estadísticamente significativas (Figura 2.26).

4. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES DEL pSymB DE *S. meliloti* RELACIONADOS CON OSMOADAPTACIÓN.

Los resultados de tolerancia a salinidad indicaban que en el pSymB existe al menos una región de 200 Kb que contiene uno o más genes importantes para la tolerancia de esta bacteria al estrés salino.

Si bien la amplitud de las deleciones en ambas cepas no pudo ser mapeada con exactitud, los análisis “in silico” y la anotación en la base de datos de la secuencia del genoma de *S. meliloti* 1021, indicaron que dicha región comprende unos 198 genes, desde el gen SMb20485 hasta el gen SMb21081 aproximadamente. Una combinación de estos datos con los estudios de microarrays permitió deducir que de estos 198 genes, 72 (un 36% aproximadamente) habían sido catalogados como osmorregulados, de los que 21 aparecieron como reprimidos y 51 como inducidos (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). Apoyando la importancia de esta región para la osmoadaptación de *S. meliloti* 1021, la densidad de genes osmorregulados en esta región del pSymB resultó ser 2,3 veces mayor que la media del genoma. Por otro lado, observando en detalle el contenido génico de esta región, se pudo deducir que 66 (92%) de esos 72 genes osmorregulados, codificarían proteínas con una función desconocida o hipotética, lo que sugería que esta región del pSymB pudieran estar codificadas funciones o mecanismos de osmoadaptación desconocidos.

Con esta combinación de datos se decidió realizar el estudio genético de buena parte de los genes osmorregulados contenidos en dicha región de 200 Kb del pSymB. Para seleccionar cada uno de los nuevos genes objeto de estudio, se utilizaron dos o más de los siguientes criterios:

- que su transcripción se viese aumentada tras un choque osmótico
- que su inducibilidad en medios hiperosmóticos hubiese sido verificada por otras metodologías (p.e., RT-PCR)
- que estuviesen localizados en la región del pSymB de 200 Kb identificada como importante para el crecimiento de *S. meliloti* en medios salinos
- que las hipotéticas proteínas tuviesen alguna relación con procesos de adaptación a estrés

- que las hipotéticas proteínas, aún siendo de función totalmente desconocida, estuviesen ampliamente conservadas en otros organismos.

Realizar un estudio de este calibre requería la disponibilidad de mutantes en cada uno de los genes seleccionados, para lo que se dispuso de una importante colección de mutantes derivados de *S. meliloti* 2011 (Pobigaylo *et al.*, 2006). La mutateca, realizada en el laboratorio de la Dra. Anke Becker (Universidad de Bielefeld, Alemania), está disponible a través de la página; www.cebitec.uni-bielefeld.de/transcriptomics/sm-genome/sm-mutagenesis.html. Los mutantes están contruidos con transposones miniTn5-Gus, de forma que cada uno está provisto de dos fragmentos variables de 24 pb de ADN o también denominados secuencias “tag” únicas. Estas “etiquetas” fueron principalmente diseñadas para poder analizar en un solo experimento la implicación en competitividad, supervivencia y capacidad simbiótica de múltiples genes de *S. meliloti*.

De la colección de mutantes en el genoma de la cepa de *S. meliloti* 2011 fue posible disponer de un grupo de 22 cepas portadoras de sendas inserciones miniTn5-Gus en otros tantos genes, que fueron seleccionados en base a los criterios descritos anteriormente (Tabla 2.4). 15 de ellos fueron seleccionados porque los genes estaban osmorregulados y se localizaban en la región de pSymB delecionada en la cepa RmF514. Los mutantes en los genes SMb20099 y SMb20968 fueron seleccionados por la posible relación de sus productos con el metabolismo de síntesis y degradación de trehalosa y, por tanto, por su relación con la adaptación a condiciones de estrés osmótico. Finalmente, los mutantes en los genes SMb20345, SMb20346, SMb21448, SMb21406 y SMb21407 porque además de localizarse en el plásmido pSymB, su inducción por estrés osmótico había sido estudiada mediante PCR cuantitativa en tiempo real. De particular interés resultaban los genes SMb20537 y SMb20522. El primero de ellos porque podría codificar para un regulador transcripcional de tipo LacI. Estos reguladores pertenecen a una familia de represores de más de 25 miembros conocidos implicados en la regulación del metabolismo de azúcares y aminoácidos mayoritariamente (Weickert y Adhya, 1992; Nguyen y Saier, Jr., 1995). Además, SMb20537 está localizado dentro de la región delecionada de RmF514 cuya osmorregulación fue verificada por PCR cuantitativa. Por otro lado, el gen SMb20522 codifica una pequeña proteína de 122 aminoácidos. Aunque esta proteína es de función desconocida, forma un dominio con estructura secundaria característica en “beta barrel” y se encuentra muy conservado (en tamaño y secuencia) en diversas especies de arqueas, bacterias y plantas.

Tabla 2.4. Conjunto de genes de *S. meliloti* en los que se dispuso de mutantes para su estudio en condiciones de estrés osmótico.

Nombre del gen	Anotación según la base de datos
SMb20487	Permeasa transportadora de azúcares de tipo ABC
SMb20520	Proteína hipotética
SMb20522	Proteína hipotética
SMb20534	Proteína hipotética
SMb20535	Deshidrogenasa (putativa)
SMb20536	Proteína hipotética
SMb20537	Regulador transcripcional (putativo)
SMb20538	Proteína de unión a solutos (putativa)
SMb20541	Proteína en ISRM14 (putativa)
SMb20555	Proteína hipotética
SMb21030	Proteína hipotética
SMb21044	Ligasa de ADN dependiente de ATP
SMb21059	Transferasa de grupos citidilos a glucosa-1-fosfato (putativa)
SMb21069	Proteína de membrana (hipotética)
SMb21073 (exoF2)	Proteína exportadora de azúcares de membrana externa (putativa)
<u>SMb20099</u>	Trehalosa sintasa (putativa)
<u>SMb20968</u>	Proteína hipotética
SMb20345	Proteína similar a AcrA (posible componente de una bomba de destoxicación)
SMb20346	Proteína similar a AcrB (posible componente de una bomba de destoxicación)
SMb21448	DNA polimerasa (putativa)
SMb21406	Probable glutatión S-transferasa
SMb21407	Proteína hipotética conservada

En **negrita**; genes localizados en la región de pSymB delecionada en RmF514. Subrayados; genes que codifican posibles proteínas relacionadas con osmoadaptación, como son la trehalosa sintasa (TreS) y posible glicosil hidrolasa (con dominio trehalasa). En **gris**; genes que fueron estudiados por PCR cuantitativa.

4.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES SMb20346, SMb20522 y SMb21407 EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.

Como se ha podido comprobar en el primer apartado de este capítulo, la expresión de algunos de los genes osmorregulados no pudo verificarse por la técnica de RT-PCR cuantitativa. Entre ellos destacamos los genes SMb20522, SMb20346 y SMb21407 que habían sido previamente seleccionados por su posible relación con procesos de adaptación a estrés. Con esta técnica no pudimos detectar los suficientes niveles de ARNm a los 60 minutos de la adición de NaCl en medio mínimo (ver Tabla 2.2).

Una de las ventajas que poseen los mutantes de *S. meliloti* 2011 es que además del transposón junto con las secuencias “tag”, también tienen insertado el gen reportero “*gusA/uidA*” (Pobigaylo *et al.*, 2006). De esta manera, se pudo aprovechar la orientación correcta de este gen *gusA* en las inserciones del miniTn5 de los mutantes SMb20522⁻, SMb20346⁻ y SMb21407⁻ para determinar la regulación de la transcripción de estos genes por estrés osmótico.

Se determinó la actividad β-glucuronidasa en los mutantes SMb20522⁻, SMb20346⁻ y SMb21407⁻ en medio mínimo a lo largo de la curva de crecimiento. Para ello, se partió de matraces de 20 ml de medio y se inocularon con 200 μl (2x10⁸ células) de cultivo. Al día siguiente, cuando los cultivos llegaron a una DO_{600nm} de 0,4 se adicionó NaCl al medio hasta alcanzar una concentración final de 400 mM. Después se recogieron los cultivos y se midió la actividad β-glucuronidasa a las 1, 4, 8, 12 y 24 horas después de la adición de la sal (Figura 2.27). En todos los casos se incluyó la expresión de los genes a lo largo de la curva de crecimiento en medio mínimo sin sal añadida (Figura 2.27, barras de color azul).

La expresión del gen SMb20522 en medio mínimo con NaCl aumentó de forma significativa a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 2.27A), particularmente a partir de las 4 horas tras el choque salino.

Los niveles de expresión observados en condiciones normales para el gen SMb20346 fueron bastante elevados desde el inicio, aunque fueron siempre superiores en presencia de NaCl. Las diferencias de expresión entre el medio salino y el control aumentaron a lo largo del tiempo (Figura 2.27B).

Al igual que lo observado para el gen SMb20522, la expresión de SMb21407 no varía a la hora tras la adición de NaCl, aunque aumenta significativamente tras 4 horas de la adición de la sal (Figura 2.27C).

Estos resultados permitieron verificar la inducibilidad por choque osmótico de estos 3 genes.

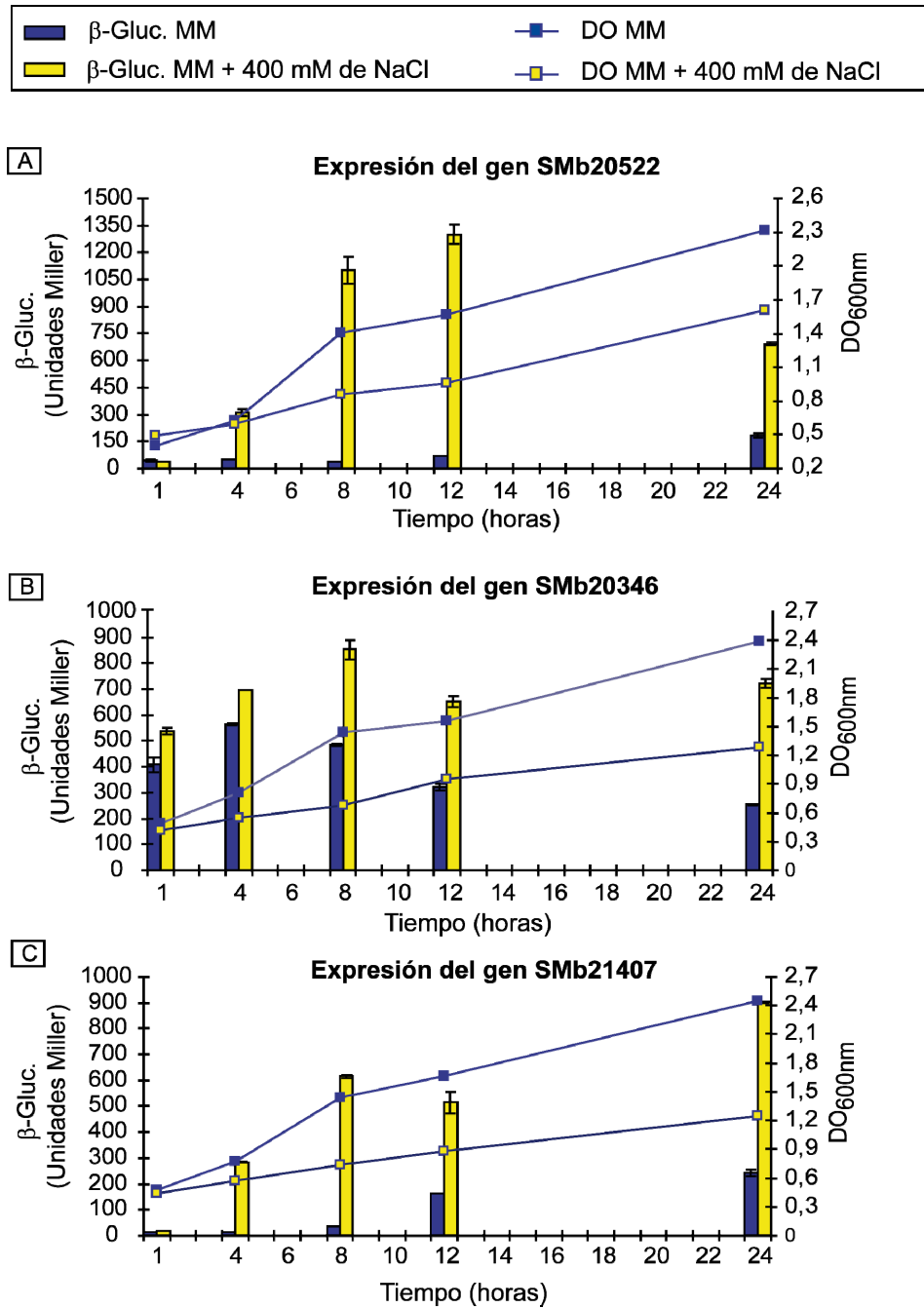


Figura 2.27. Estudio de la expresión de los genes SMB20522 (A), SMB20346 (B) y SMB21407 (C) a distintos tiempos tras un choque salino (400 mM NaCl). Las barras corresponden a la actividad β -glucuronidasa (β -gluc) según la escala de la izquierda, y las líneas continuas representan las curvas de crecimiento.

4.2. CAPACIDAD DE OSMOADAPTACIÓN EN VIDA LIBRE DE MUTANTES EN GENES DEL pSymB DE *S. meliloti*.

4.2.1. Crecimiento de mutantes derivados de *S. meliloti* 2011 en medio sólido.

Una forma rápida de comprobar cuáles de los mutantes eran importantes para la tolerancia a estrés salino, fue a través de ensayos de crecimiento sobre placas de medio sólido adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa. En cada placa se compararon varios mutantes con la cepa parental (*S. meliloti* 2011) a partir de gotas de 10 µl de diluciones seriadas (desde 10^2 hasta 10^5 ufc) de cada cepa.

Por razones de espacio, los 22 mutantes fueron divididos en 4 grupos. Se ensayó su crecimiento relativo sobre placas de medio mínimo (MM) y medio mínimo adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl, y 500 mM de sacarosa.

Se hizo un seguimiento diario tomando fotografías de las placas, observándose que la cepa parental 2011 crecía más rápido que algunos de los mutantes. A excepción de los mutantes SMb20520⁻ y SMb20346⁻, que crecieron de forma semejante a 2011, la mayoría de ellos presentaron diferencias en el crecimiento en una o varias de las condiciones de estrés osmótico ensayadas. En algunos, como por ejemplo SMb20487⁻, SMb20522⁻ y SMb20968⁻, dichas diferencias eran mayores en medio adicionado con NaCl que con sacarosa (Figura 2.29).

Con un grupo de 6 cepas mutantes que parecían mostrar un crecimiento menor en medio salino, se repitieron los estudios en MM adicionado de 300 mM o 400 mM de NaCl. Como se observa en la figura 2.30, se confirmó el crecimiento reducido de los mutantes SMb20345⁻, SMb20487⁻, SMb20968⁻, SMb21407⁻ y SMb20537⁻ con respecto a su cepa parental en medios de elevada osmolaridad.

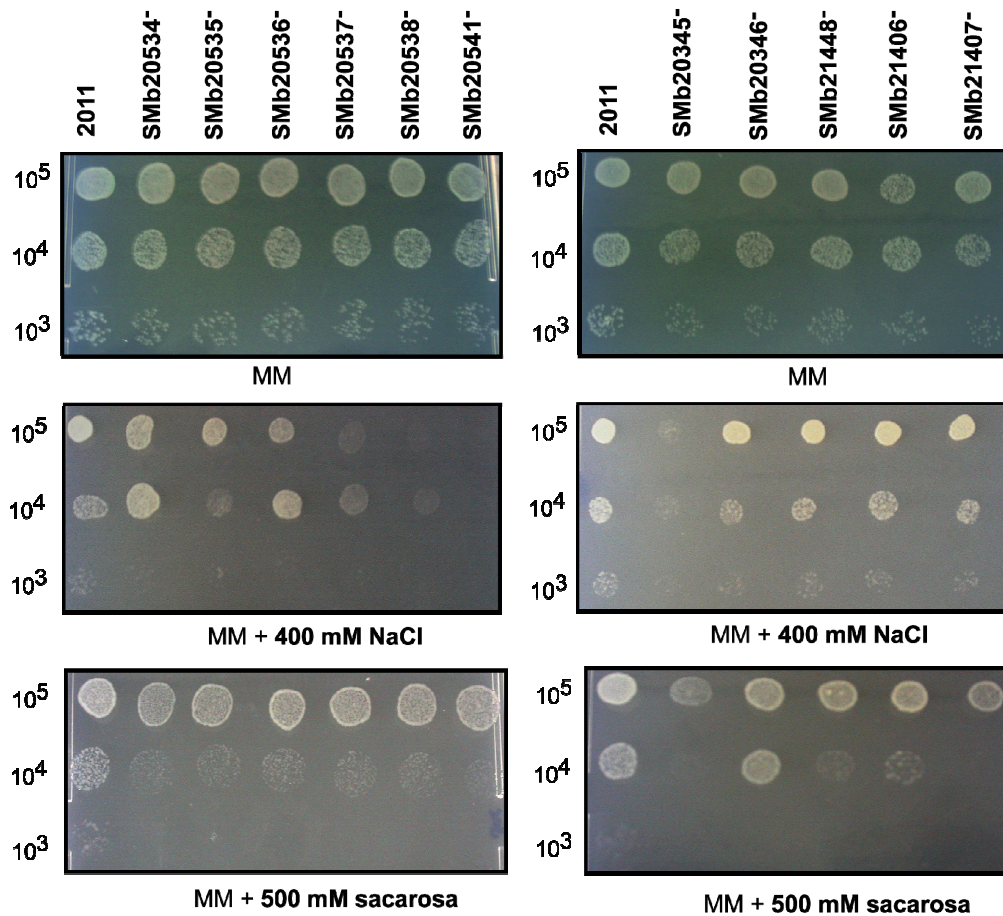


Figura 2.28. Crecimiento relativo de mutantes derivados de *S. meliloti* 2011 en MM sólido adicionado de 400 mM de NaCl y 500 mM de sacarosa.

Finalmente, en este estudio se observó que de los 22 mutantes seleccionados, todos salvo SMb20520⁻ y SMb20346⁻, tenían disminuida su capacidad de crecimiento en alguna de las condiciones de estrés ensayadas.

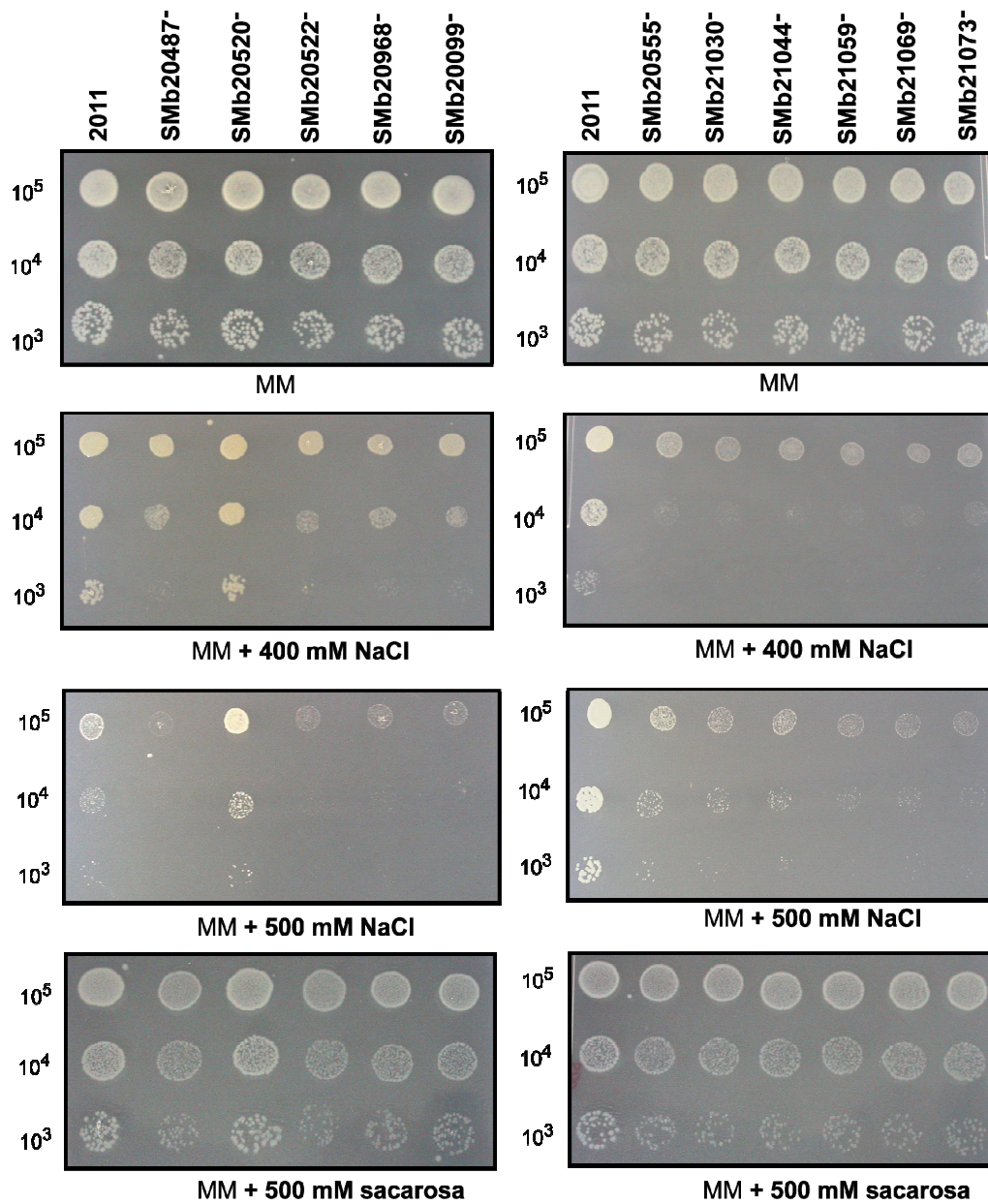


Figura 2.29. Crecimiento relativo de mutantes derivados de *S. meliloti* 2011 en MM sólido adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl y 500 mM de sacarosa.

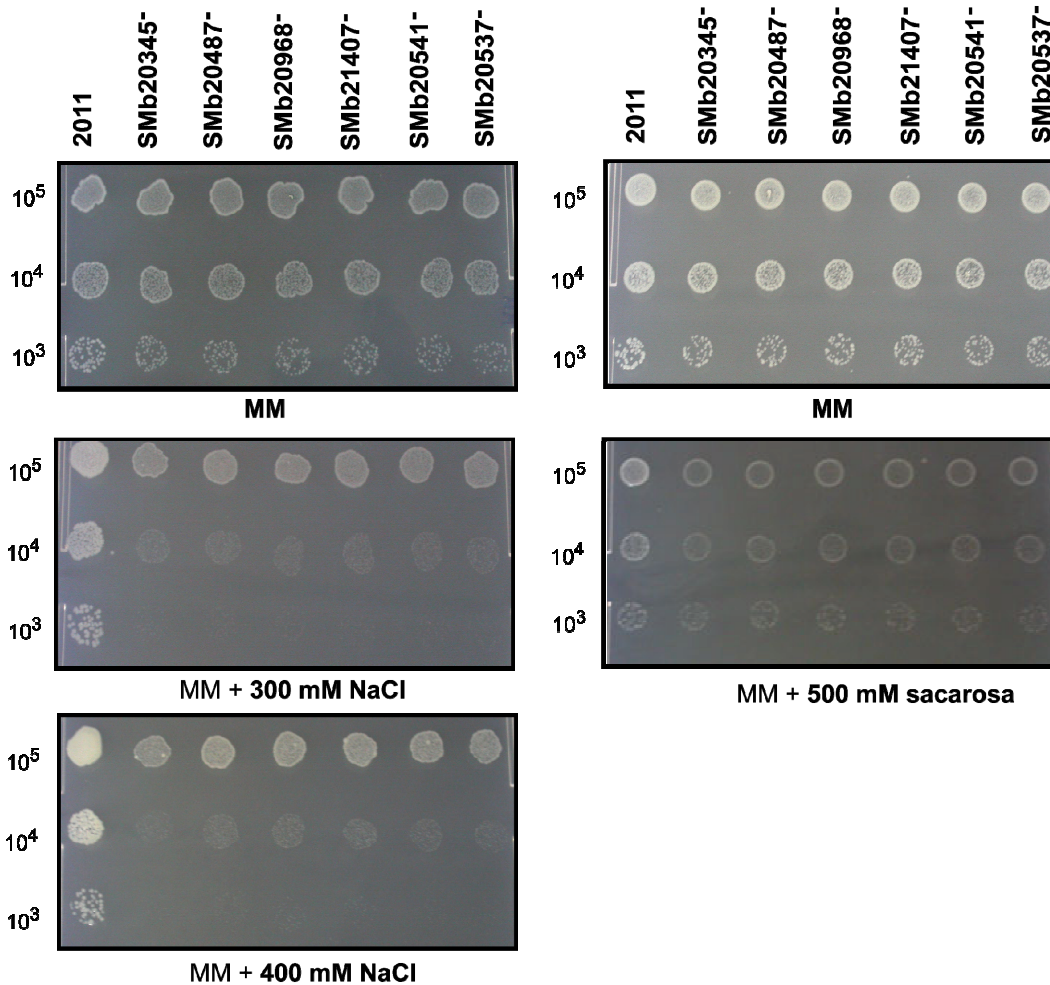


Figura 2.30. Crecimiento de los mutantes SMB20345⁻, SMB20487⁻, SMB20968⁻, SMB21407⁻ y SMB20537⁻ en MM sólido adicionado de 300 mM y 400 mM de NaCl y 500 mM de sacarosa.

4.2.2. Crecimiento de mutantes derivados de *S. meliloti* 2011 en medio líquido.

Se estudió el crecimiento en medio mínimo líquido adicionado de 300 mM o 400 mM de NaCl de 7 de las cepas que mostraron reducida su capacidad de osmoadaptación en medio sólido. Se realizaron curvas de crecimiento en matraces de 22 ml de cultivo. En las figuras 2.31 y 32 se presentan las curvas de crecimiento de 6 de estas 7 cepas, Los resultados obtenidos fueron diferentes a los observados en medio sólido. Aunque la mayoría de la cepas mostraron un retraso en medio salino, también mostraron ligeros retrasos en las condiciones control (Figuras 2.31A y 32A). En cualquier caso, las diferencias de crecimiento en MM líquido adicionado de 300 mM y 400 mM de NaCl no parecían tan importantes como las observadas en MM sólido.

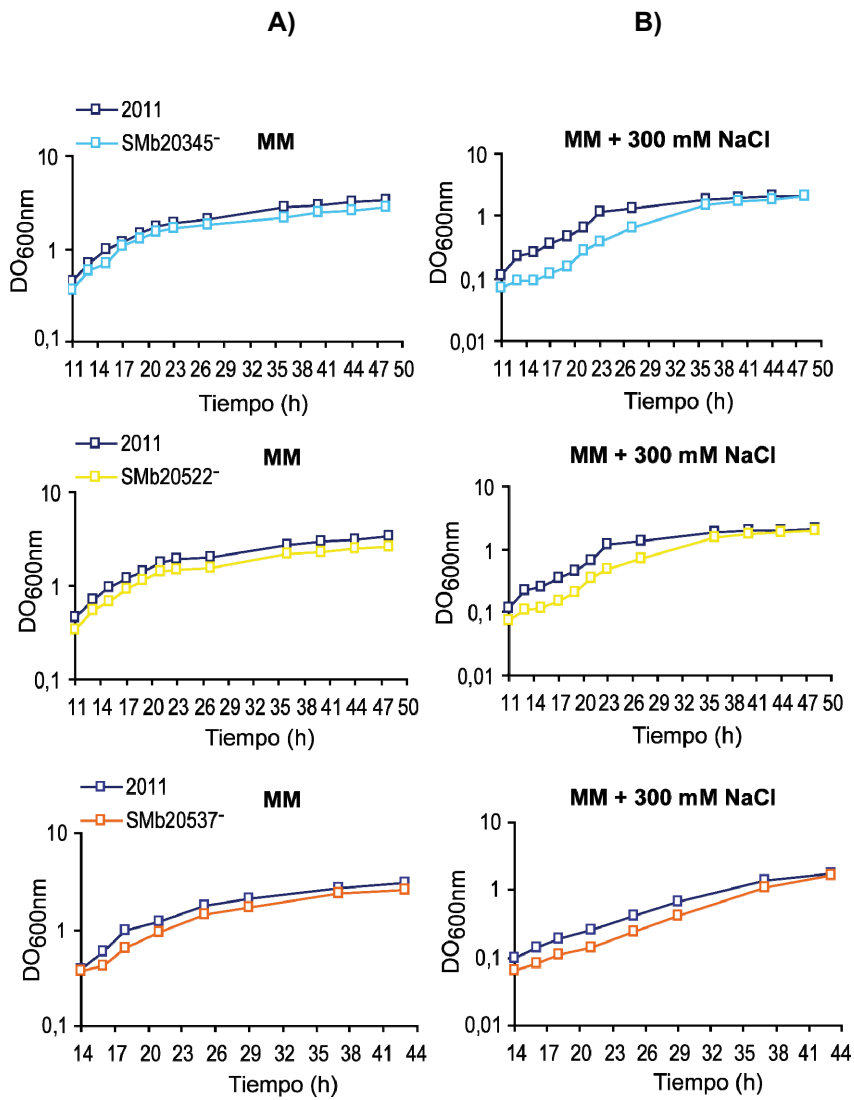


Figura 2.31. Crecimiento de cepas SMb20345⁻, SMb20522⁻ y SMb20537⁻ en MM (A) y MM adicionado de 300 mM de NaCl (B).

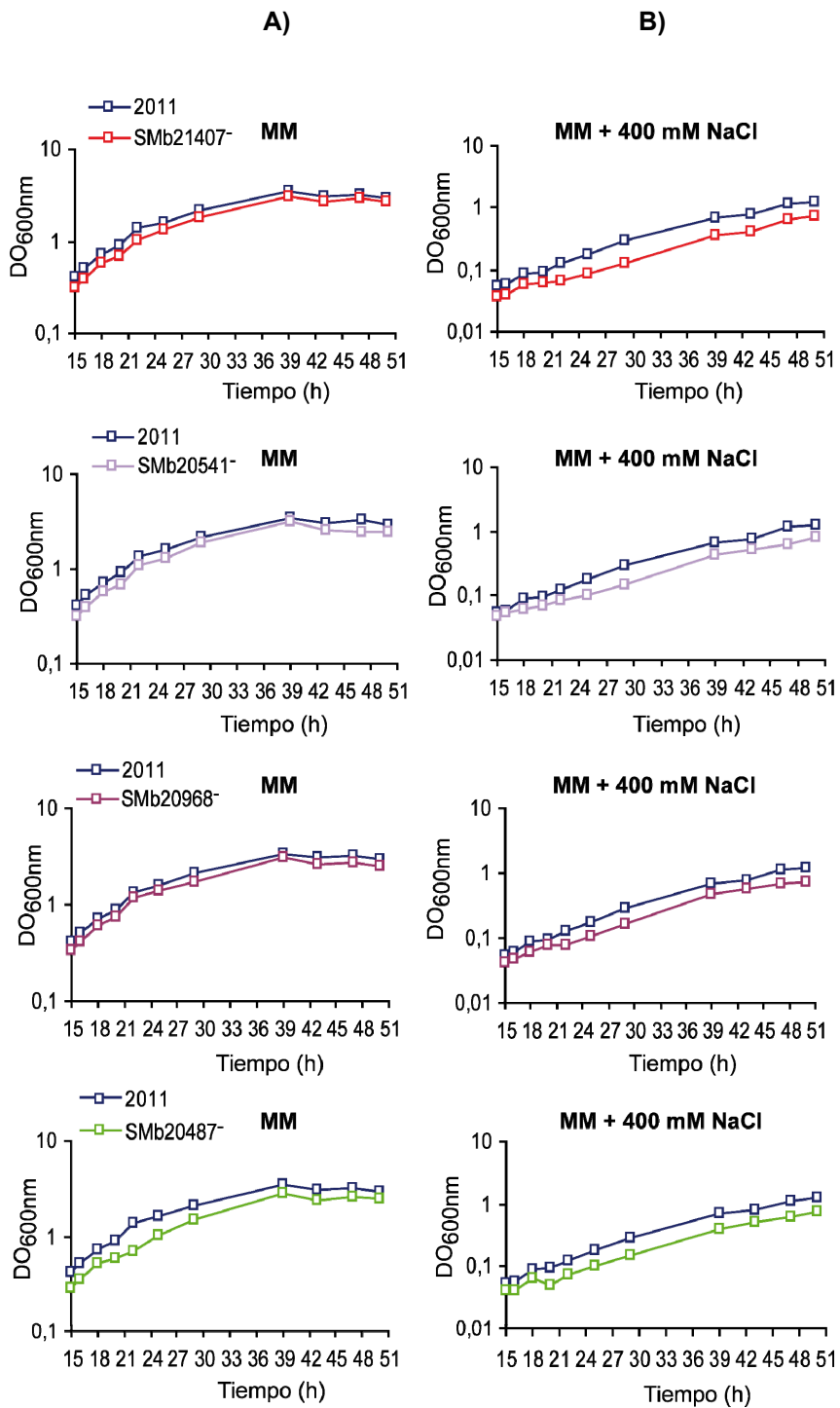


Figura 2.32. Crecimiento de las cepas SMB20487⁻, SMB21407⁻, SMB20541⁻ y SMB20968⁻ en MM (A) y MM adicionado de 400 mM de NaCl (B).

4.3. CAPACIDAD DE OSMOADAPTACIÓN DE MUTANTES DE *S. meliloti* 2011 PORTADORES DE INSERCIONES DE MINI $Tn5$ EN REGIONES INTERGÉNICAS.

La inconsistencia de los resultados de tolerancia a sal entre el medio sólido y líquido obtenidos con estos mutantes ponía en duda la fiabilidad de los mismos, y por tanto generaba incertidumbre sobre el aparente fenotipo mostrado en condiciones de estrés salino. Cabía la posibilidad de que dicho fenotipo no estuviese asociado a las mutaciones generadas por el mini $Tn5$ en cada cepa, sino que fuese la propia presencia del transposón la responsable de dicho comportamiento. Por ello se decidió estudiar el fenotipo de tolerancia a sal de cepas portadoras de inserciones de este mini $Tn5$ en regiones intergénicas, esto es, no asociadas a zonas codificantes ni a secuencias promotoras del genoma de *S. meliloti* 1021.

Para ello, a partir del mismo banco de mutantes de la Universidad de Bielefeld, se seleccionó un grupo de 5 cepas derivadas de *S. meliloti* 2011, portadoras de inserciones de mini $Tn5$ en zonas intergénicas, de acuerdo a la anotación disponible de dicho genoma (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Mutantes de *S. meliloti* 2011 portadores de mini $Tn5$ insertado en regiones intergénicas (Pobigaylo *et al.*, 2006).

^a Identificación	^b Región intergénica
E12 2011m $Tn5$ STM.1.08. E12	SMb20223--(231365/231366)--SMb20225
A02 2011m $Tn5$ STM.1.14. A02	SMb20463--(476450/476449)--SMb20464
H04 2011m $Tn5$ STM.2.12. H04	SMb20490--(508633/508634)--SMb20491
G04 2011m $Tn5$ STM.2.01. G04	SMb20538--(563952/563953)--SMb20539
A12 2011m $Tn5$ STM.1.14. A12	SMb21034--(653269/653268)--SMb21035

^a Identificación de los mutantes según la lista publicada en la página; www.cebitec.uni-bielefeld.de/transcriptomics/sm-genome/sm-mutagenesis.html

^b Localización de los mutantes junto con los genes que los flanquean.

Los mutantes que aparecen en subrayado portan inserciones del transposón localizadas dentro de la región delecionada en la cepa RmF514.

Se ensayó la tolerancia a sal de estas cepas en condiciones similares que para los mutantes anteriores, aunque en este caso se utilizaron dos medios mínimos distintos (Figura 2.33): el medio mínimo Robertsen modificado (MM), que es el medio que habitualmente se ha empleado en este trabajo, y el medio mínimo Vincent (VMM)

que fue el medio de selección utilizado durante el proceso de obtención de las mutaciones en *S. meliloti* 2011 (Pobigaylo *et al.*, 2006). Las diferencias en la composición de ambos medios están descritas en el correspondiente apartado de material y métodos.

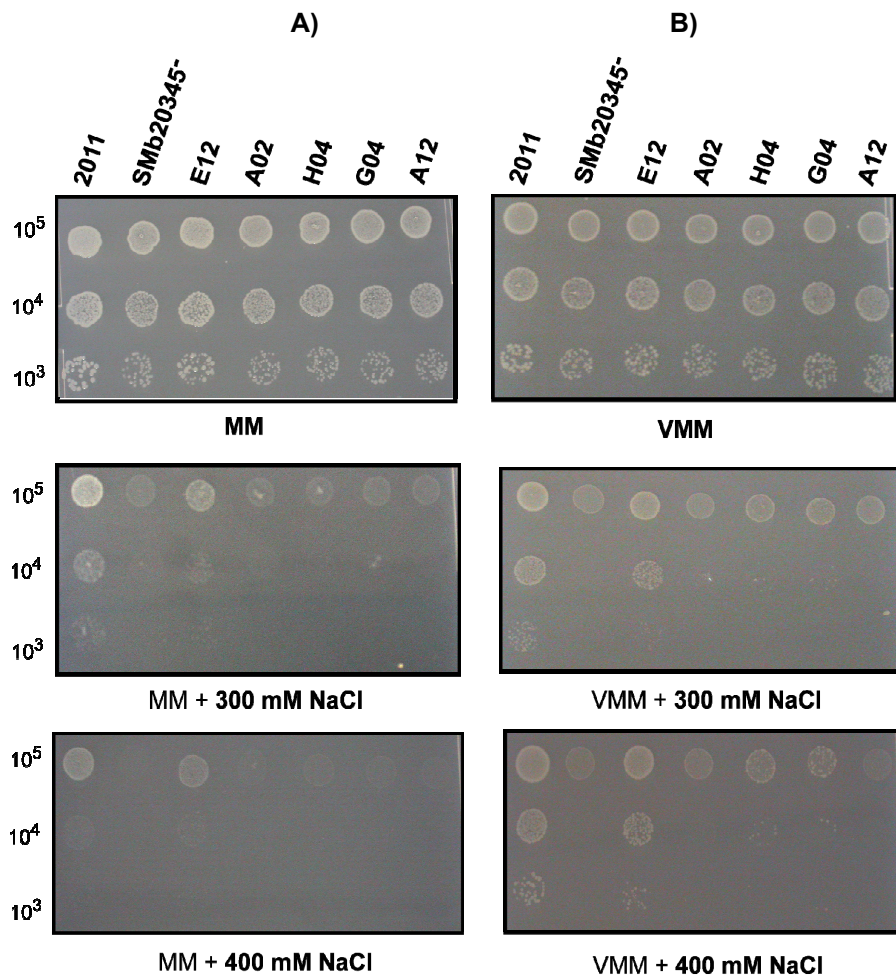


Figura 2.33. Crecimiento de mutantes portadores de miniTn5 en regiones intergénicas. A, medio mínimo Robertsen modificado (MM). B, medio mínimo Vincent (VMM) adicionado de. Se incluyen como controles la cepa parental (2011) y el mutante SMB20345⁻.

La presencia de distintas concentraciones de NaCl redujo la capacidad de crecimiento de 4 de las 5 cepas ensayadas (Figura 2.33), tanto en MM como en VMM. A excepción de la cepa E12, las cepas A02, H04, G04 y A12 mostraron diferencias significativas en el crecimiento con respecto a 2011 de forma semejante al mutante en el gen SMB20345. Por tanto, los ensayos con los mutantes en las regiones intergénicas indicaban que la presencia del miniTn5, independientemente de su localización, podría afectar notablemente al crecimiento de *S. meliloti* 2011 en

condiciones de elevada salinidad. En consecuencia, resultaba de poca utilidad el empleo de este banco de mutantes como estrategia para identificar nuevos genes involucrados en la tolerancia a salinidad de *S. meliloti*, por lo que se decidió descartar su uso y se idearon estrategias alternativas para continuar el estudio planteado inicialmente.

5. COMPLEMENTACIÓN GÉNÉTICA DE LA CEPA RmF514.

Para la identificación del gen (o genes) presentes en la región de 200 Kb del pSymb cuya ausencia causaba la reducida capacidad de crecimiento en medios salinos de la cepa RmF514, y dados los inconvenientes provocados por las cepas del banco de mutantes de la Universidad de Bielefeld, se decidió abordar una estrategia clásica, mediante complementación genética del fenotipo de esta cepa RmF514 en medio salino. Para ello se hizo uso de un banco de genes de *S. meliloti* GR4, construido sobre el vector pLAFR1 y que contiene un tamaño medio de inserto de 25 Kb por cósmido (Soto *et al.*, 1992). Los cósmidos del banco fueron introducidos “en masa” en la cepa RmF514, utilizando pRK2013 como plásmido movilizador. Se seleccionaron los transconjugantes en medio TY suplementado de los correspondientes antibióticos y 500 mM de NaCl, medio en que sólo podrían crecer aquellos transconjugantes que recibiesen cósmidos portadores de genes de *S. meliloti* GR4 cuya expresión provocara la recuperación del crecimiento en NaCl de RmF514.

De un total de 116 transconjugantes Tet^R y NaCl tolerantes, se verificó la tolerancia de un grupo de 45 colonias en TY adicionado de 500 mM de NaCl con sus respectivos controles (Figura 2.34).

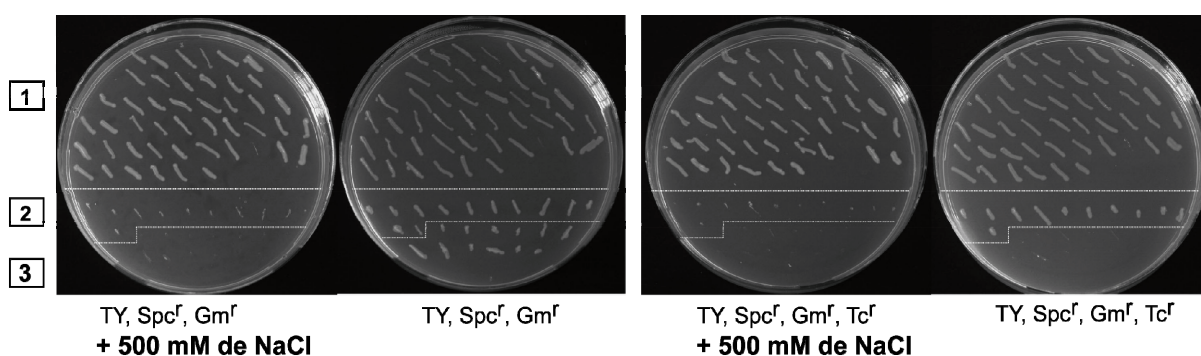


Figura 2.34. Colonias transconjugantes de RmF514. En el grupo 1 se muestran transconjugantes tolerantes a NaCl, en el 2 algunos transconjugantes que no crecieron en TY adicionado de 500 mM de NaCl y en el 3 se muestran como control varias colonias de RmF514.

Posteriormente se procedió al análisis del ADN clonado en los correspondientes cósmidos. Para ello, se aisló el ADN cósmico de 12 colonias elegidas aleatoriamente y se analizaron los perfiles de restricción con la enzima *EcoRI* (Figura 2.35A). Este análisis permitió identificar dos grupos, cada uno de los cuales incluía cósmidos con regiones de ADN solapantes. Dentro del primer grupo se incluyeron los cósmidos N° 1, 3, 5, 13 y 15, mientras que el segundo grupo incluía los cósmidos N° 7, 9, 11, 17, 19, 21 y 23 (Figura 2.35B).

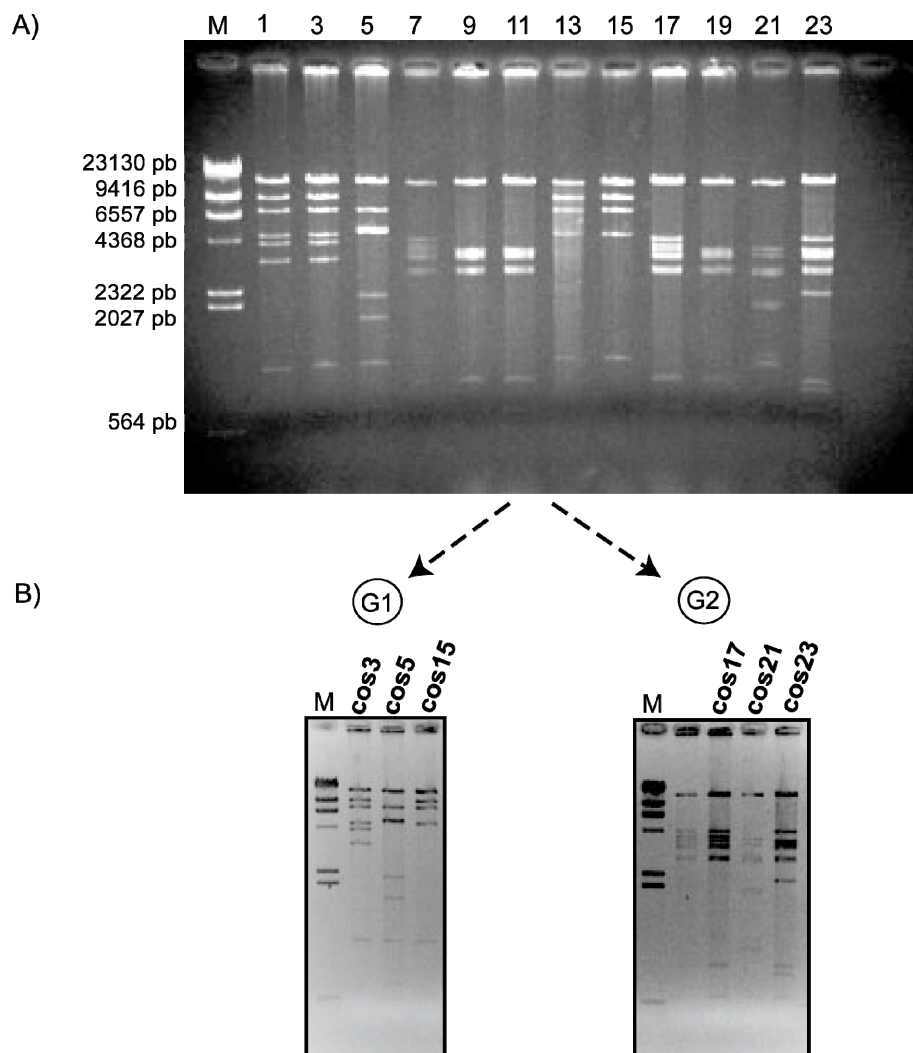


Figura 2.35. A: Análisis de los perfiles de restricción *EcoRI* de los cósmidos de transconjugantes de la cepa RmF514 que recuperaron la capacidad de crecimiento en NaCl. **B:** Perfiles de restricción en cada uno de los dos grupos de cósmidos identificados. G1; grupo 1 formado por los cósmidos 3 (cos3), 5 (cos5) y 15 (cos15), G2; grupo 2 formado por los cósmidos 17 (cos 17), 21 (cos21) y 23 (cos23). M; marcador de peso molecular.

Estos resultados indicaban que el genoma de *S. meliloti* GR4 contiene al menos dos regiones genéticas diferentes que permitían a la cepa RmF514 recuperar el crecimiento en NaCl (Figura 2.35). Antes de continuar con la identificación y localización de estas regiones en el genoma de *S. meliloti*, fue necesario verificar que efectivamente se trataba de una verdadera complementación genética, lo que implicaba, por un lado, determinar si las regiones de ADN contenidas en los cósmidos complementantes estaban ausentes en la cepa RmF514, y por otro verificar que la reintroducción en *trans* de estas regiones efectivamente permitía a esta cepa recuperar el crecimiento en medio salino. Se llevaron a cabo sendas hibridaciones del ADN genómico de RmF514 (y también de RmF909), frente al ADN de los cósmidos cos3 y cos17.

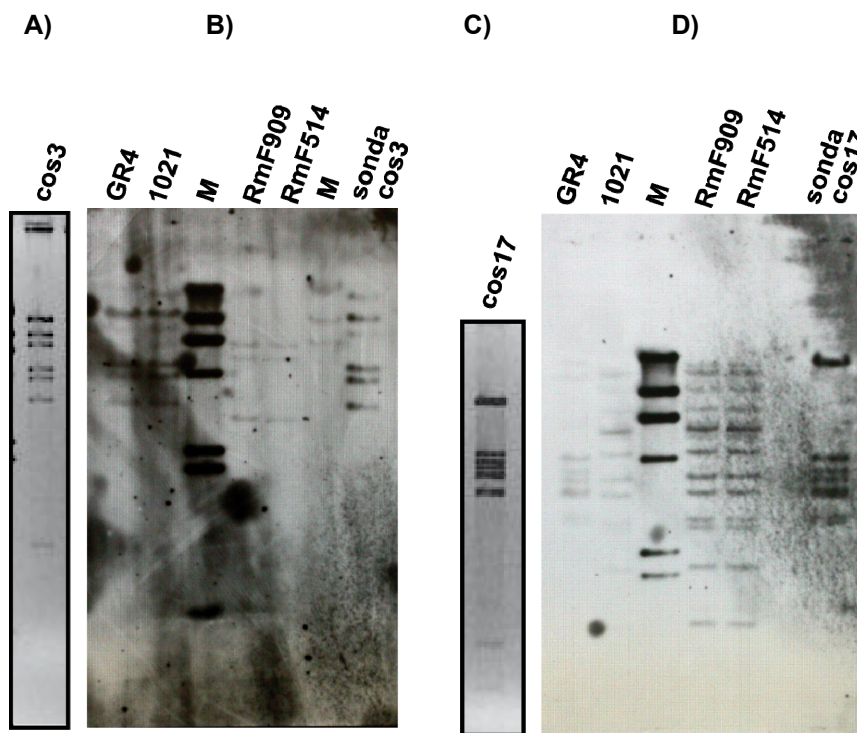


Figura 2.36. Hibridaciones de los ADNs genómicos de las cepas silvestres GR4 y 1021 y las cepas mutantes RmF909 y RmF514 digeridos con *EcoRI*. Se utilizaron como sondas los cósmidos cos3 (B) y cos7 (D). Se muestran como referencia los perfiles de restricción de cada una de las sondas empleadas (A y C). M; marcadores moleculares marcados con digoxigenina.

Aunque la calidad de la hibridación no fue óptima, los resultados obtenidos permitieron establecer que la región de ADN contenida en el cósmido 3 estaba

ausente en las cepas RmF514 y RmF909 (Figura 2.36A). Respecto al cósmido 17, si bien el perfil de restricción fue muy diferente entre las cepas 1021 y GR4, fue posible observar que tanto las cepas RmF514 como RmF909 presentaban un perfil de bandas similar a la cepa silvestre 1021 (Figura 2.36B), lo que indicaba que esta región, aún cuando permite complementar el defecto de crecimiento en medio salino de la cepa RmF514, está presente en esta cepa. La complementación genética del fenotipo de RmF514 podría explicarse por la presencia de este ADN en multicopia. Otra posibilidad es que el ADN del cósmido 17 sea exclusivo de la cepa GR4 y que las bandas de hibridación observadas en 1021 sean debidas a hibridación no específica. O bien que tratándose de la misma región génica, existan algunas diferencias entre las cepas 1021 y GR4. En cualquier caso, lo que si parecía más plausible era que la región de ADN del grupo 1 de cósmidos, al estar ausente en la cepa RmF514 y complementar el fenotipo de osmotolerancia de esta cepa, fuese candidata a contener genes implicados en osmoadaptación.

Por otro lado, los cósmidos 3, 5 y 15 fueron reintroducidos en la cepa RmF514, y se determinó el fenotipo de crecimiento en medio salino de varios transconjugantes. Los resultados obtenidos confirmaban la recuperación del crecimiento de la cepa RmF514 en condiciones de elevada salinidad por este grupo de cósmidos (Figura 2.37).

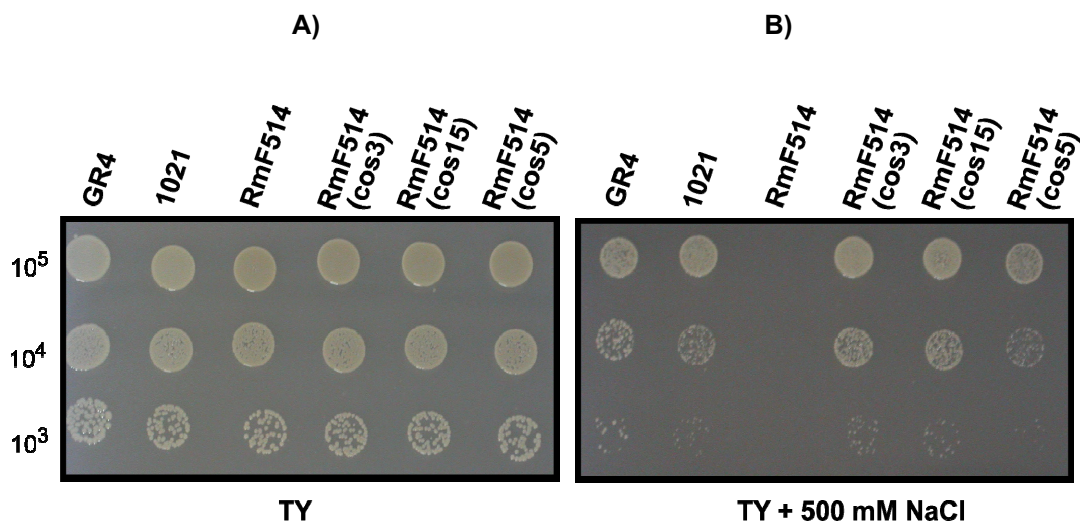


Figura 2.37. Comprobación de la recuperación del crecimiento de la cepa RmF514 en condiciones de elevada salinidad por cósmidos del grupo 1.

5.1. Identificación y caracterización de genes de pSymB implicados en tolerancia a estrés salino.

Para identificar la región de ADN que complementaba el fenotipo de la cepa RmF514, se clonaron individualmente los fragmentos *EcoRI* del cósmido 15 en el vector pUC18 y se secuenciaron los extremos de dos fragmentos de 4,8 Kb y 1,1 Kb, respectivamente. La comparación de la secuencia resultante con la secuencia genómica del plásmido pSymB de *S. meliloti* facilitó la localización de una región de aproximadamente 45 Kb en la que se pudo identificar los fragmentos de ADN que estaba presente en todos los cósmidos del grupo 1: cos 3, 15 y 5 (Figura 2.38).

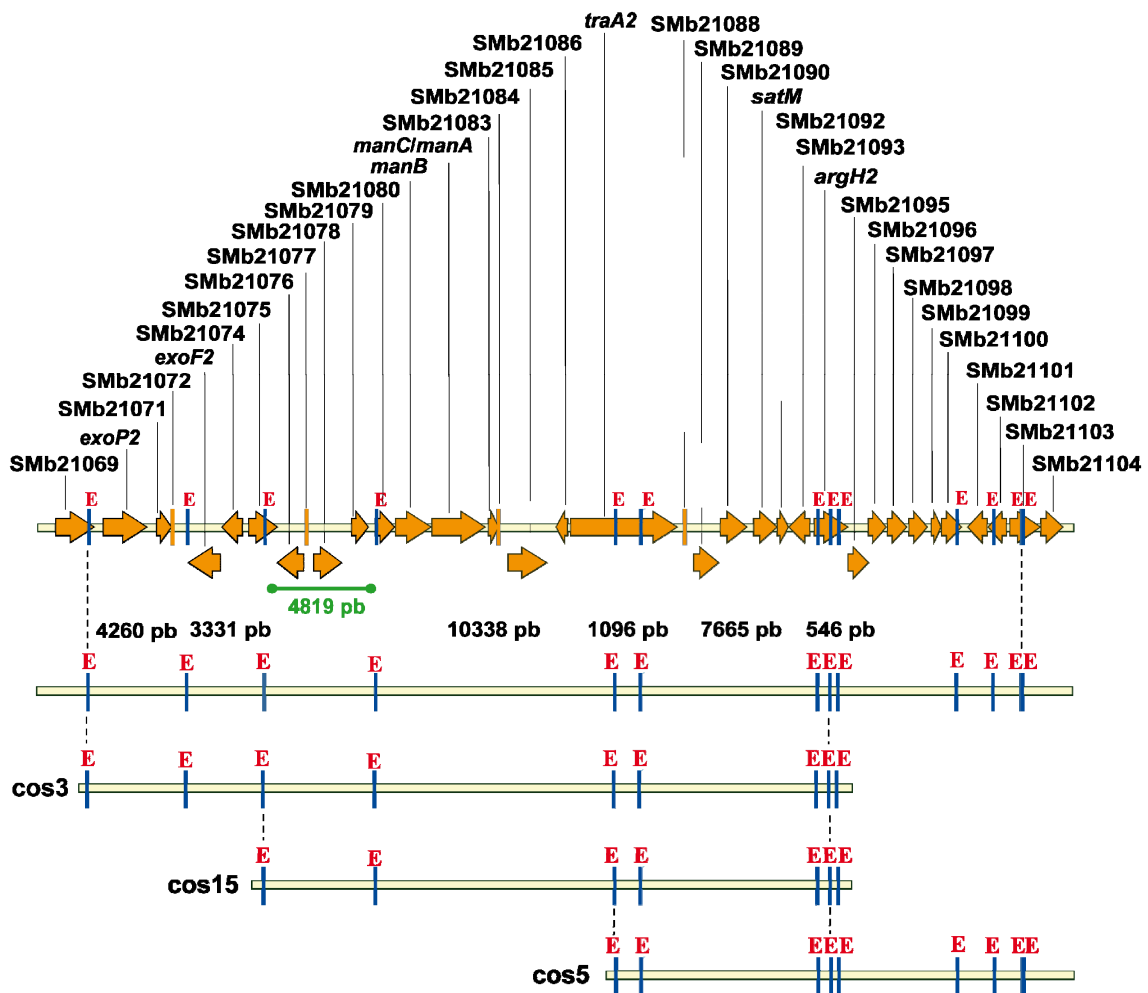


Figura 2.38. Esquema de la región genética común a los cósmidos 3, 15 y 5. Se muestra una representación esquemática del mapa y los perfiles de restricción *EcoRI* (E) de los cósmidos. En verde, se muestra el fragmento de ADN de 4,8 Kb secuenciado. El rectángulo de color gris representa la región de 8761 pb común a todos los cósmidos (1096pb + 7665 pb).

Finalmente, se identificó un fragmento de 7,6 Kb que contiene los genes SMb21088, SMb21089, SMb21090, *satM*, SMb21092 y SMb21093 de *S. meliloti* (Figura 2.39). Las teóricas proteínas codificadas por estos genes se muestran en la tabla 2.6.

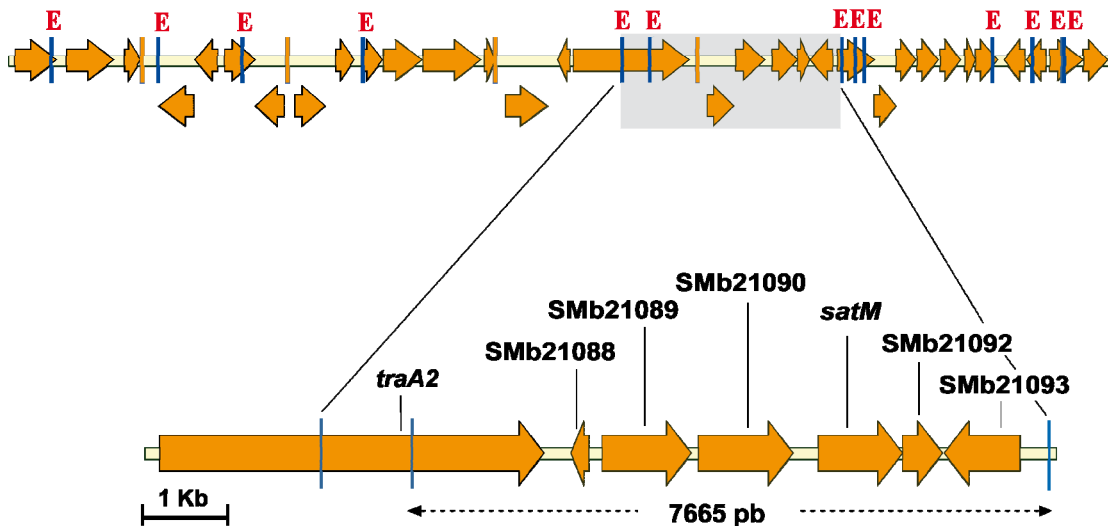


Figura 2.39. Mapa físico de la región génica común a todos los cósmidos y conjunto de genes del pSymB de *S. meliloti* que forman parte de ella. La región, de un tamaño de 7,6 Kb (729017-736681) incluye los genes SMb21088, SMb21089, SMb21090, SMb21091, SMb21092 y SMb21093.

Tabla 2.6. Genes del pSymB de *S. meliloti* localizados en el fragmento de 7,6 Kb.

Gen	Tamaño del producto (aa)	#Anotación
SMb21088	71	Proteína RB0667 (hipotética)
SMb21089	356	Carnitina deshidratasa
SMb21090	378	Proteína de membrana [Dom UgpB] (hipotética)
SMb21091	336	Enzima lítica de pared celular similar a muramidasa (putativa)
SMb21092	158	Acetyltransferasa 2.3.1. (putativa)
SMb21093	300	Regulador transcripcional de la familia LysR (putativo)

#Descripción del producto codificado por cada uno de los genes según la página de *S. meliloti* 1021; <http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi>

Con objeto de determinar cual o cuales de los genes contenidos en este fragmento de 7,6 Kb estaban implicados en la tolerancia a salinidad de *S. meliloti*, se subclonó dicho fragmento y partes definidas del mismo en el vector pJB3Tc19, y se introdujeron individualmente en la cepa RmF514 (Figura 2.40).

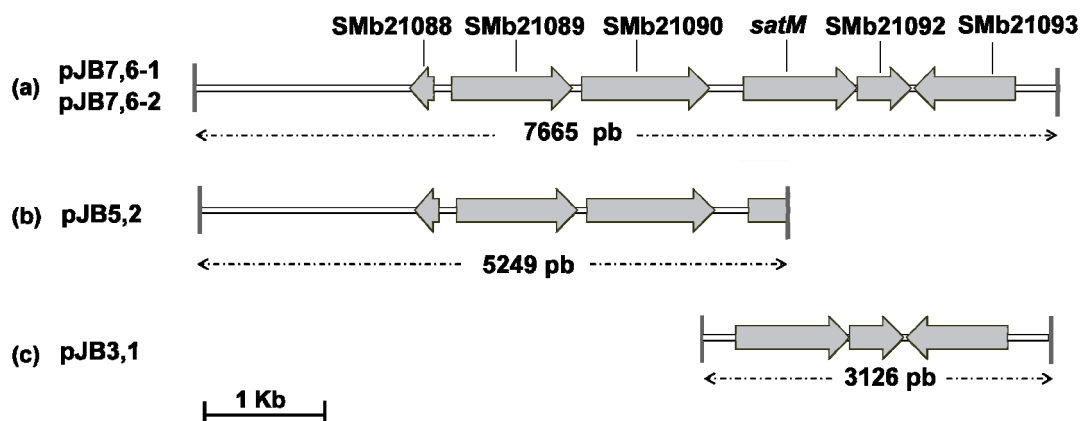


Figura 2.40. Subclonación del fragmento de 7,6 Kb y derivados del mismo. **a;** pJB7,6-1 (7665 pb), pJB7,6-2 (7665 pb insertado orientación inversa), **b;** pJB5,2 (5249 pb), **c;** pJB3,1 (3126 pb).

Las construcciones fueron introducidas en la cepa RmF514 por conjugación y se estudió la capacidad de crecimiento de los transconjugantes en medio sólido TY adicionado de 500 mM de NaCl (Figura 2.41).

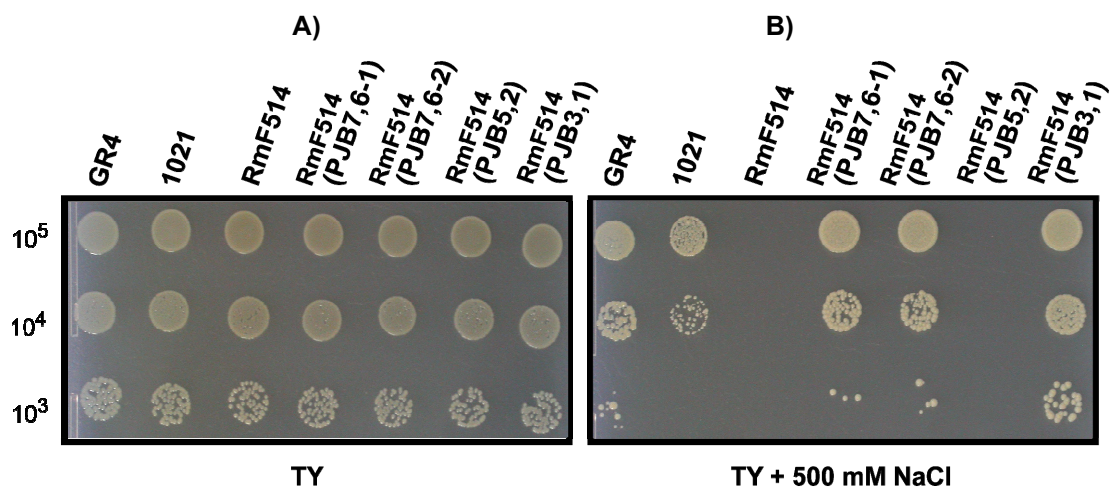


Figura 2.41. Recuperación del crecimiento de RmF514 en altas concentraciones de NaCl por las construcciones pJB7,6-1, pJB7,6-2 y pJB3,1.

En la figura 2.41B se observa que sólo las construcciones portadoras del fragmento de 3,1 Kb fueron capaces de recuperar el crecimiento en medio salino de la cepa RmF514. De acuerdo a la secuencia del genoma de *S. meliloti* 1021, en este fragmento se localizaban 3 posibles ORFs: SMb21091, SMb21092 y SMb21093.

Para conocer cual de estos genes era realmente importante en condiciones de estrés salino, se continuó con la subclonación de fragmentos de la región de 3,1 Kb, de tal modo que se obtuvieron dos nuevos plásmidos: pJBlysR que contenía los genes SMb21091 y SMb21092, y pJB1,89 que contenía el gen SMb 21093 (Figura 2.42).

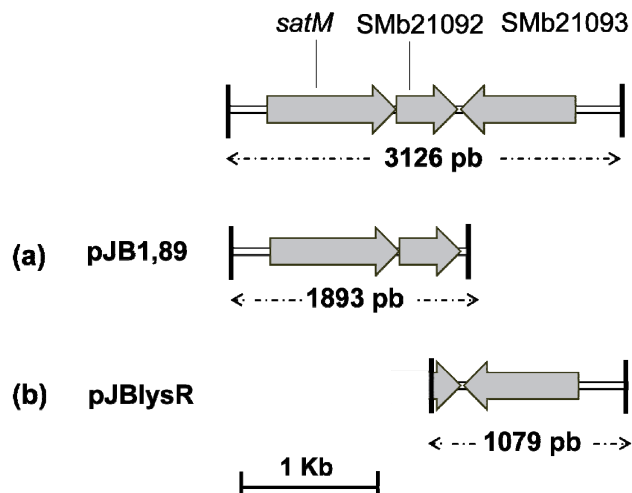


Figura 2.42. Representación esquemática de las construcciones pJB1,89 y pJBlysR.

Después de movilizar dichas construcciones hasta la cepa RmF514 se estudió la capacidad de crecimiento de los correspondientes transconjugantes, tanto en medio sólido TY como en MM adicionado de altas concentraciones de NaCl. Los ensayos en medio sólido TY mostraron la recuperación del crecimiento de la cepa RmF514 por la construcción pJB1,89, en contraste con la construcción pJBlysR, que no tuvo efecto sobre la tolerancia a sal de dicha cepa (Figura 2.43). Este resultado sugería que los genes SMb21091 y SMb21092, individual o conjuntamente, eran los responsables de la complementación genética del fenotipo de RmF514.

Por otro lado, los resultados en MM contrastaron con los obtenidos en medio TY. La capacidad de crecimiento de la cepa RmF514 en medio mínimo adicionado de altas concentraciones de sal fue similar a la de la cepa parental (Figura 2.43B).

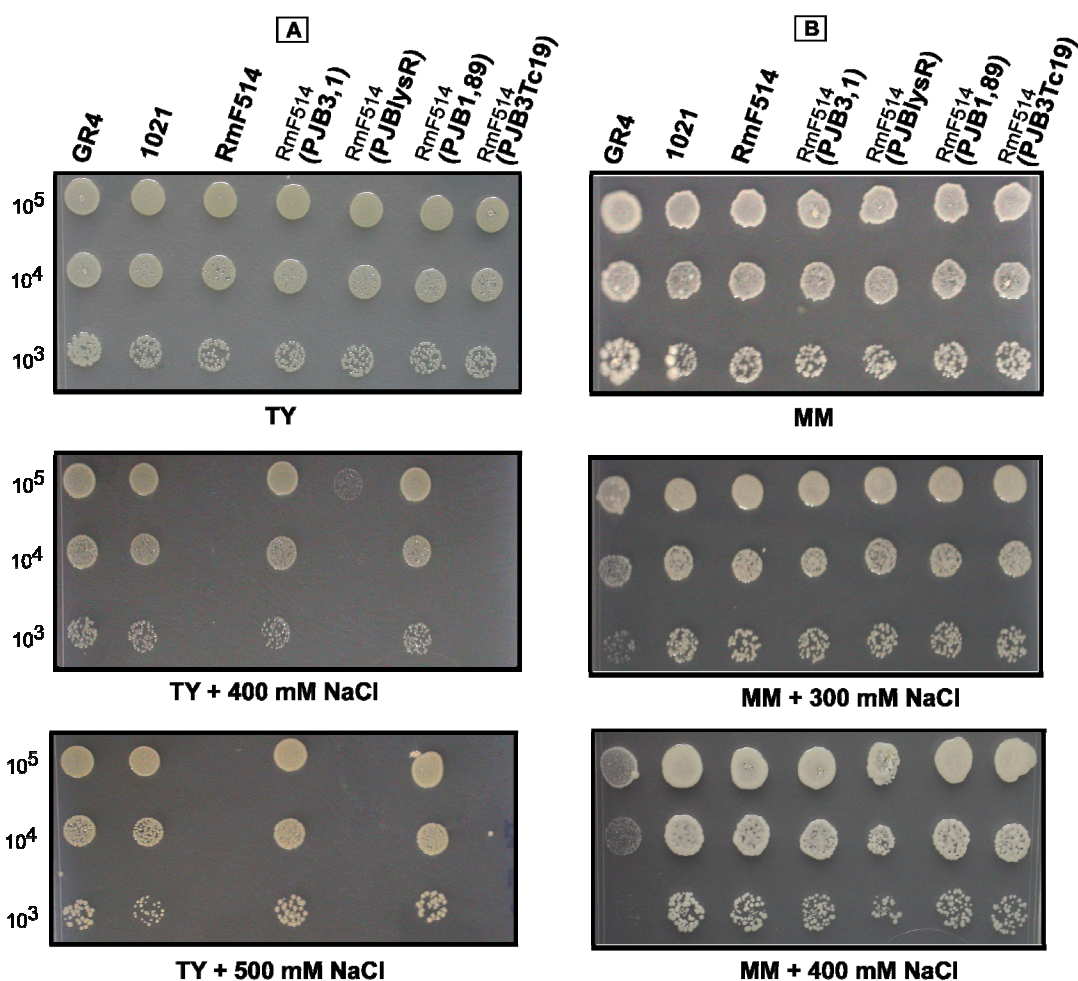


Figura 2.43. A. Recuperación del crecimiento de RmF514 en altas concentraciones de NaCl por los plásmidos pJB3,1 y pJB1,89. **B.** Crecimiento de los transconjugantes de RmF514 en MM adicionado de 300 mM y 400 mM de NaCl. Se incluye como control la cepa RmF514 con el vector pJB3Tc19.

También se estudió la capacidad de osmoadaptación de las cepas RmF514 (pJB3,1), RmF514 (pJB1,89) y RmF514 (pJBlysR) en medio TY líquido adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl (Figuras 2.44 y 45). Las curvas de crecimiento realizadas en medio TY confirmaron lo observado en medio sólido. Las construcciones pJB3,1 y pJB1,89, al contrario que pJBlysR, permitieron crecer a la cepa RmF514 a tasas similares a la cepa silvestre en medio salino.

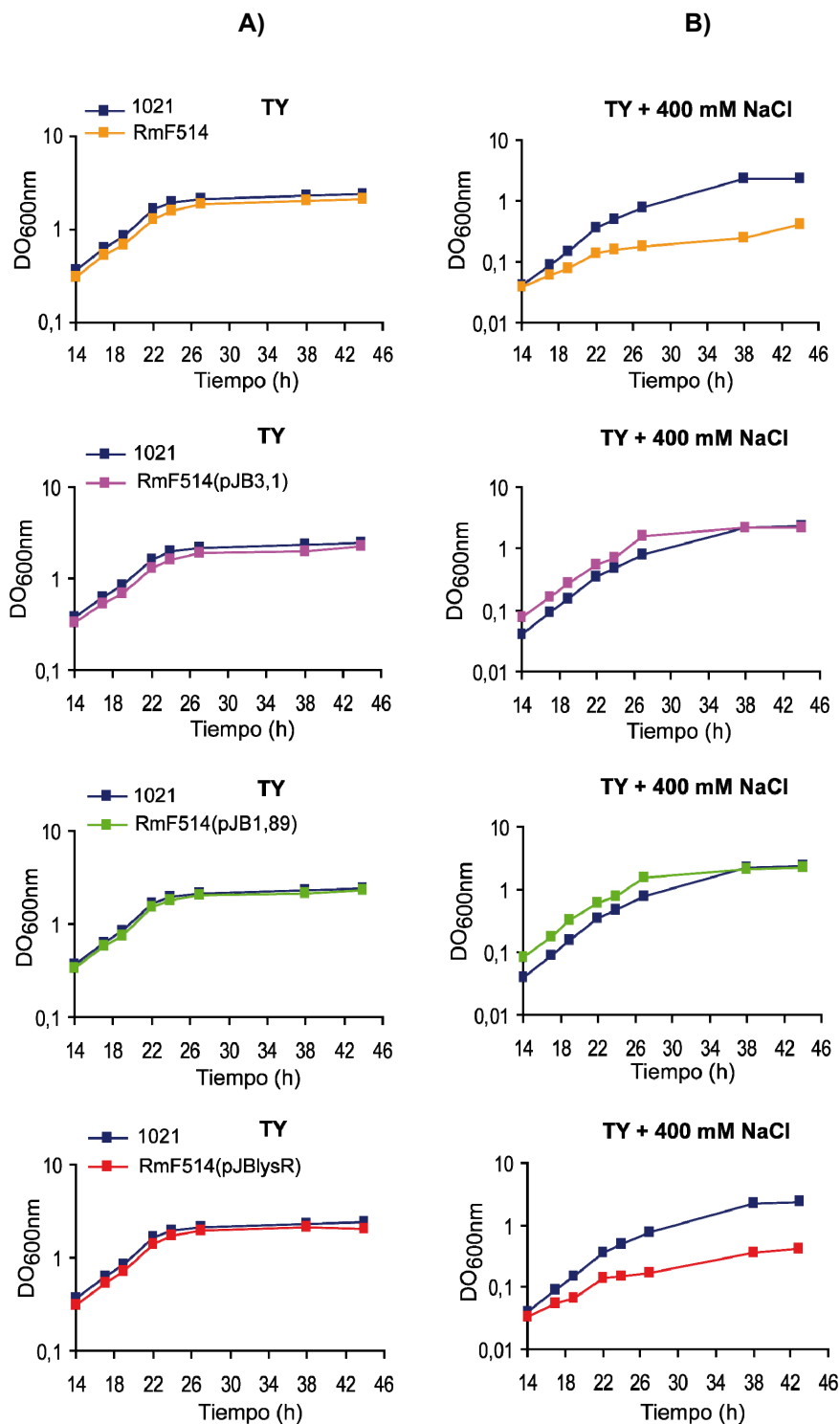


Figura 2.44. Curvas de crecimiento de las cepas RmF514 (pJB3,1), RmF514 (pJB1,89) y RmF514 (pJBlysR) en medio TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo.

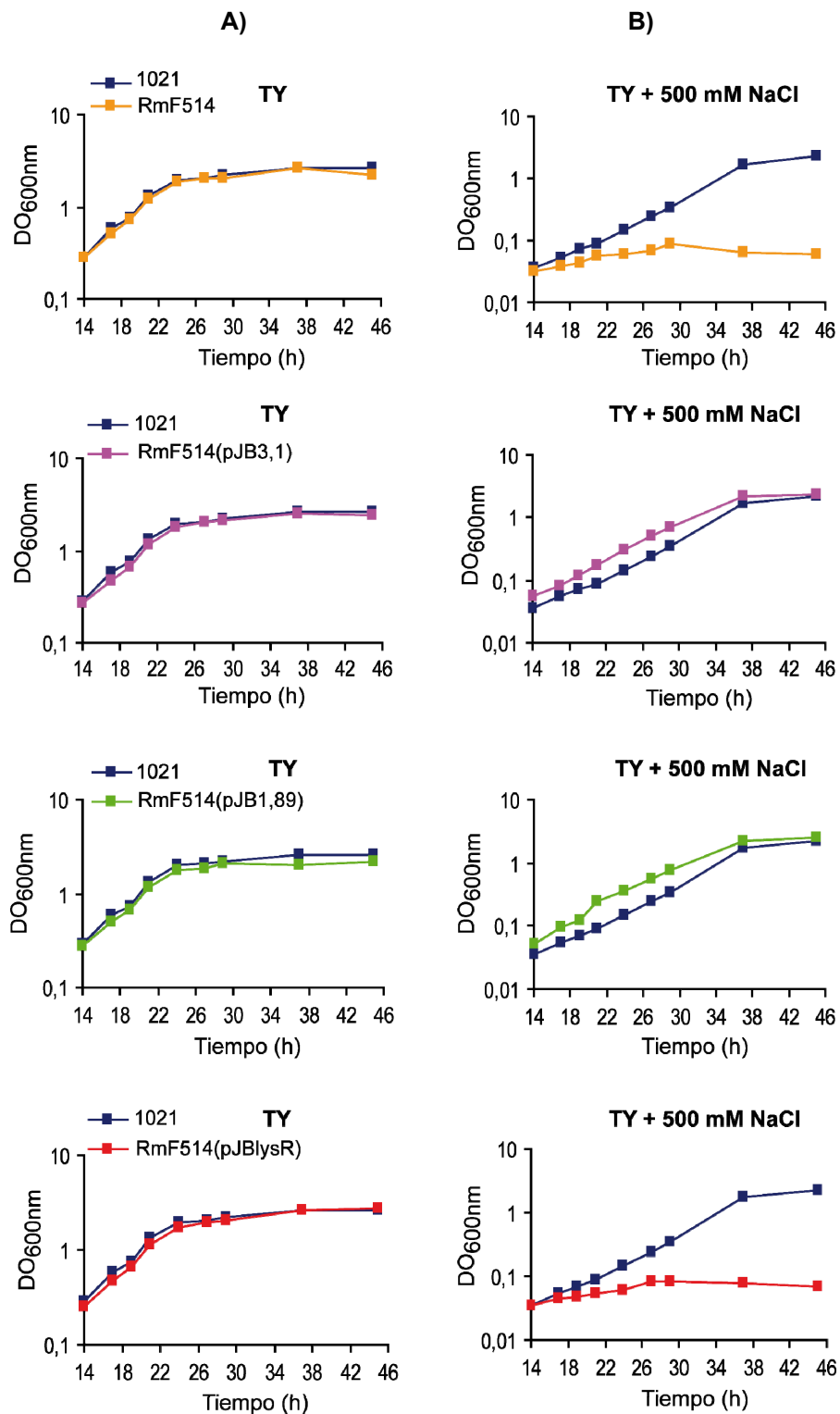


Figura 2.45. Curvas de crecimiento de las cepas RmF514 (pJB3,1), RmF514 (pJB1,89) y RmF514 (pJBlysR) en medio TY adicionado de 500 mM de NaCl desde el inicio del cultivo.

Las curvas de crecimiento realizadas en medio TY confirmaron lo observado en medio sólido. Las derivadas de RmF514 complementadas por las construcciones pJB3,1 y pJB1,89 no mostraron su capacidad de crecimiento disminuida en TY adicionado de 400 y 500 mM de NaCl. Estas cepas incluso desarrollaron una tasa de crecimiento superior a la de la cepa silvestre (*S. meliloti* 1021) (Figuras 2.44 y 45). No obstante, la cepa portadora del plásmido pJBlysR mostró una capacidad de crecimiento disminuida en altas concentraciones de sal, en comparación con *S. meliloti* 1021, un resultado que confirmó lo observado en medio TY sólido.

Estos datos confirmaron que la presencia de la región formada por los genes SMb21091 y SMb21092 recuperaba el crecimiento de la cepa mutante RmF514 en NaCl. Es decir, uno de los dos genes o la función conjunta de ambos tendría un papel importante en el proceso de osmoadaptación de *S. meliloti* a estrés salino. Con objeto de discernir la importancia de cada uno de estos dos genes, se obtuvieron dos nuevas construcciones, pJB1,6 y Δ pJB1,89. La primera contenía el gen SMb21091 íntegro, mientras que, la segunda, derivada del plásmido pJB1,89, contenía el gen SMb21092 junto a un gen SMb21091 mutado en el que se deleccionaron 163 pb. Esta delección originó una mutación no polar en el gen SMb21091 que *a priori* no tendría porqué afectar a la expresión del gen SMb21092.

La construcción de los plásmidos Δ pJB1,89 y pJB1,6 se describe en el anexo 5 de este capítulo.

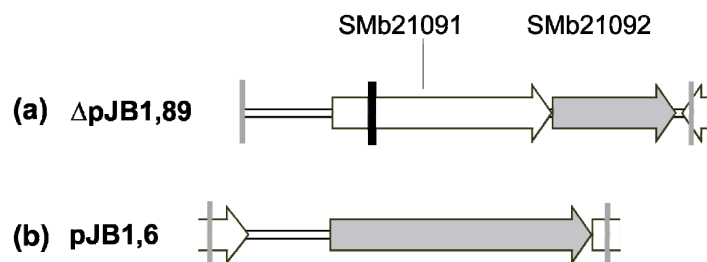


Figura 2.46. Representación esquemática de las construcciones Δ pJB1,89 (a) y pJB1,6 (b).

Los plásmidos fueron introducidos en RmF514 y se determinó la capacidad de crecimiento en medio salino de los correspondientes transconjugantes. Como se muestra en la figura 2.47, sólo la construcción portadora de un gen SMb21091 funcional fue capaz de recuperar el crecimiento de RmF514, lo que indicaba que era la ausencia de este gen la que determinaba la incapacidad de esta cepa para crecer en medios salinos.

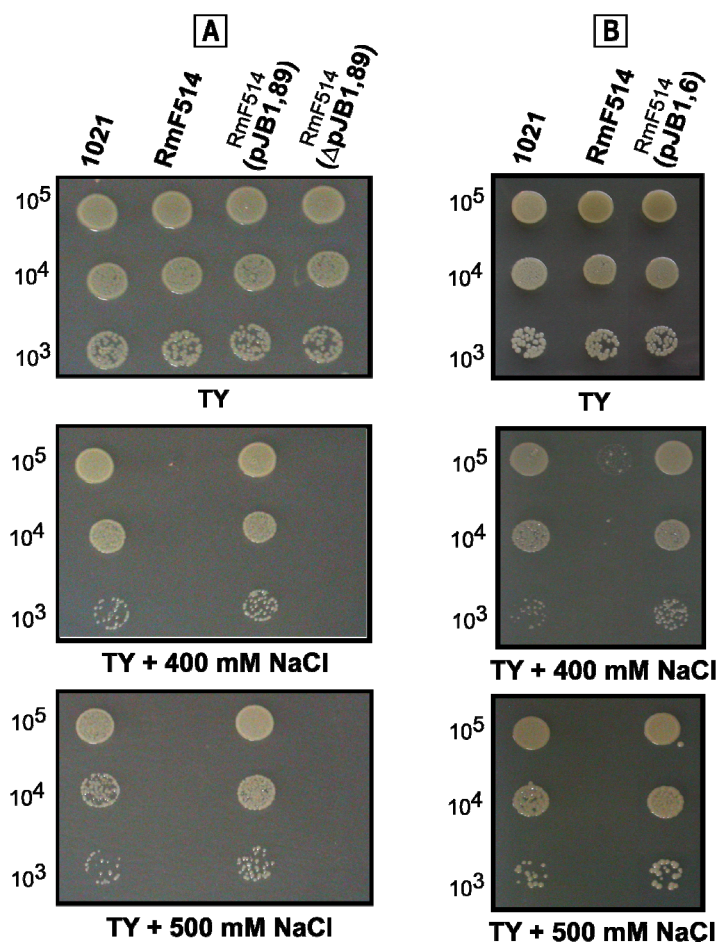


Figura 2.47. Recuperación del crecimiento de RmF514 en altas concentraciones de NaCl por los plásmidos pJB1,89 (A) y pJB1,6 (B).

6. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES SMb21091 (*satM*) y SMb21092 DE *Sinorhizobium meliloti* 1021.

6.1. Análisis “in silico” de los genes SMb21091 (*satM*) y SMb21092 de *S. meliloti*.

Estos dos genes se encuentran adyacentes en el pSymB de *S. meliloti* 1021 y podrían formar un operón. El gen SMb21091 codifica para una proteína de 336 aminoácidos con un dominio glucosil hidrolasa, que podría tratarse de una lisozima muramidasa (3.2.1.17) o enzima lítica de la pared celular. Es bastante posible que esta proteína pueda existir en otras especies del orden Rhizobiales, ya que posee elevada homología con otras hipotéticas glicosilhidrolasas presente en los genomas anotados de rizobios y otras bacterias filogenéticamente relacionadas (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Similitud del producto del gen SMb21091 de *S. meliloti* 1021 con proteínas de otras bacterias.

Organismo	Gen	Tamaño de la proteína (aa)	Identidad
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	Smed_4990	333	89%
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	RHE_CH02244	346	72%
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	RlegDRAFT_1761	348	70%
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	RL2574	321	74%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	Meso_0635	334	67%
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	Oant_3491	355	64%
<i>Brucella ovis</i> ATCC 25840	Bov_A0425	363	67%
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	Atu0233	365	66%
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	mlr0125	317	66%
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	SMc01846	261	53%

El análisis filogenético de SatM, muestra la elevada conservación de esta proteína en rizobiales. En la figura 2.48 pueden observarse tres grupos diferenciados de similitud. En primer lugar, aparece el grupo de SatM de *S. meliloti* 1021 que posee elevada homología con proteínas de las especies de *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum* principalmente. A continuación, se observa un segundo grupo compuesto mayoritariamente por distintas especies de *Brucella* y *Mesorhizobium*, destacando entre ellas a *M. loti* MAFF303099. Finalmente, aparece un tercer grupo en el que se puede apreciar la similitud que posee SatM de *S. meliloti* 1021 con otra hipotética glicosilhidrolasa del mismo genoma (NP 386302. 1) que estaría codificada por el gen SMc01846 (ver **tabla 2.7**). Proteína que parece localizarse también en las bacterias de *Rhizobium* filogenéticamente relacionadas.

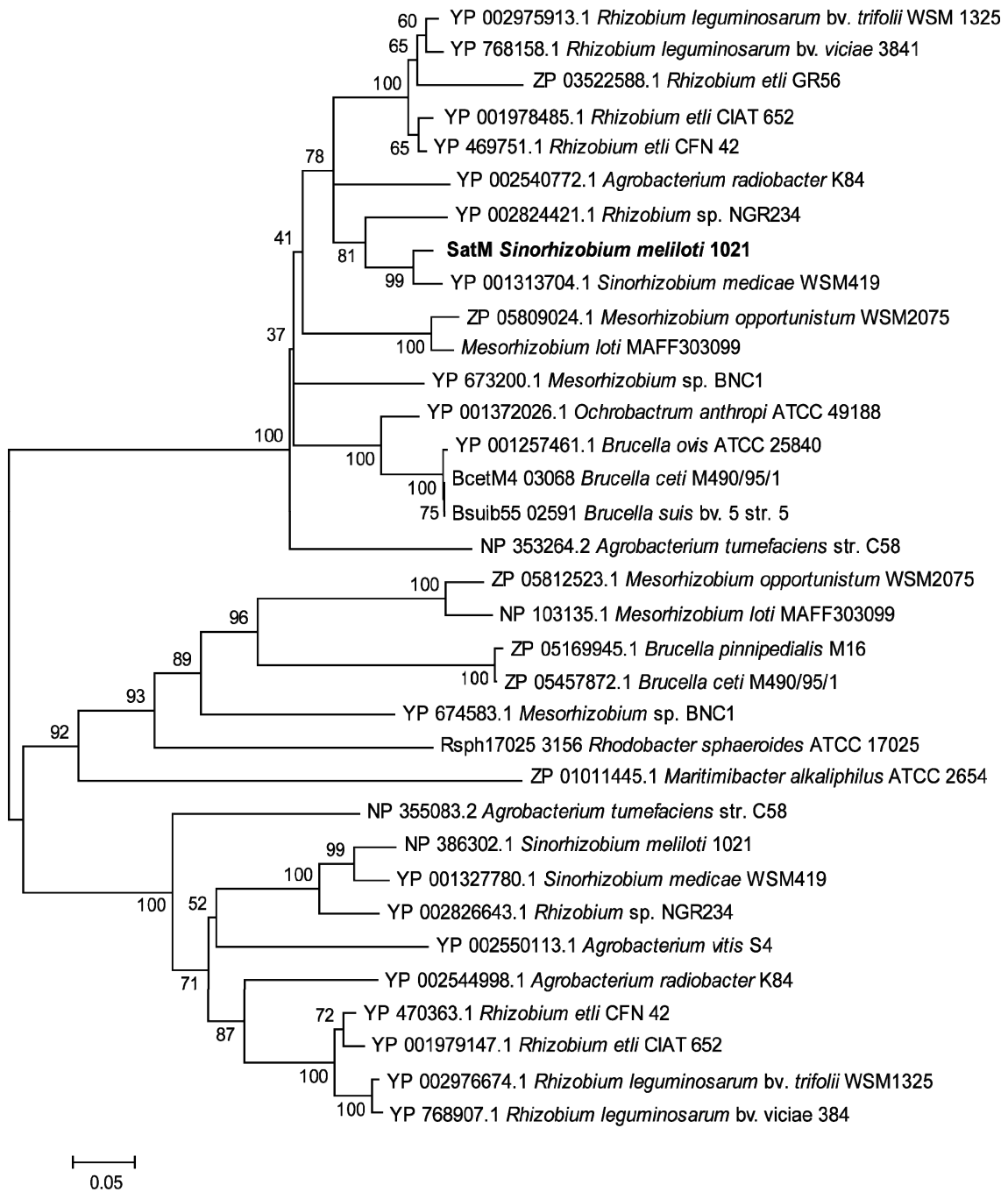


Figura 2.48. Análisis filogenético de SatM.

Por otro lado, el gen SMb21092 se encuentra anotado en el pSymB de *S. meliloti* como una putativa acetiltransferasa de 158 aminoácidos, que a diferencia de SMb21091, no parece tener equivalentes en otros miembros de la familia *Rhizobiaceae*, excepto en *S. medicae* WSM419, donde además parece conservada la disposición de los ortólogos a SMb21091-SMb21092. La función de la proteína codificada por este gen es desconocida, si bien existen proteínas con cierta similitud de secuencia y tamaño en otras bacterias (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Homología de la proteína SMb21092 de *S. meliloti* 1021 con otras proteínas bacterianas.

Organismo	Gen	Tamaño de la proteína (aa)	Identidad
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	Smed_4989	156	79%
<i>Vibrio cholerae</i> MZO-3	VIBHAR_01129	162	35%
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060		159	48%
<i>Reinekea</i> sp. MED297		159	37%
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	Bmul_2198	161	35%

Con estos antecedentes, se planteó la construcción de mutantes individuales de *S. meliloti* 1021 en cada uno de los genes. Para SMb21091 se obtuvieron dos mutantes, denominados 091⁻(pCH091) y 091⁻(pS092), que se construyeron por simple recombinación a través de la integración de dos vectores suicidas diferentes. El mutante en el gen SMb21092 (092⁻) fue construido por la técnica de intercambio alélico. La obtención de los distintos mutantes se describe en los anexos 5 y 6 de este capítulo.

6.2. Capacidad de osmoadaptación de mutantes en los genes SMb21091 y SMb21092 de *S. meliloti*.

Se realizaron curvas de crecimiento en medio TY adicionado de 400 mM de NaCl y además se determinó el crecimiento de los mutantes sobre placas de TY sólido adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl y 700 mM de sacarosa. Como se puede observar en las figuras 2.49, 2.50 y 2.51, sólo los mutantes para el gen SMb21091 presentaron una capacidad de crecimiento disminuida con respecto a la parental en medios con altas concentraciones de NaCl. Estas diferencias fueron evidentes tanto en medio líquido como en sólido y fueron observadas en las dos cepas mutantes en

SMb21091. El efecto del NaCl sobre el crecimiento de la cepa 091⁻ en medio sólido (Figura 2.49) fue aparentemente mayor que el producido en medio líquido (Figura 2.48), en el que se evidenciaron menores tasas de crecimiento de los mutantes, si bien al final de la curva las DOs fueron equiparables a la de la cepa parental. Por otro lado, al contrario de lo ocurrido en NaCl, los mutantes en el gen SMb21091 presentaron un crecimiento similar a la cepa parental en medio TY sólido adicionado de 700 mM de sacarosa.

Finalmente, el mutante en el gen SMb21092 no se vio afectado en ninguna de las condiciones de estrés osmótico ensayadas, y su crecimiento fue muy similar al de cepa silvestre, tanto en medio líquido como sólido (Figuras 2.48, 2.49 y 2.50).

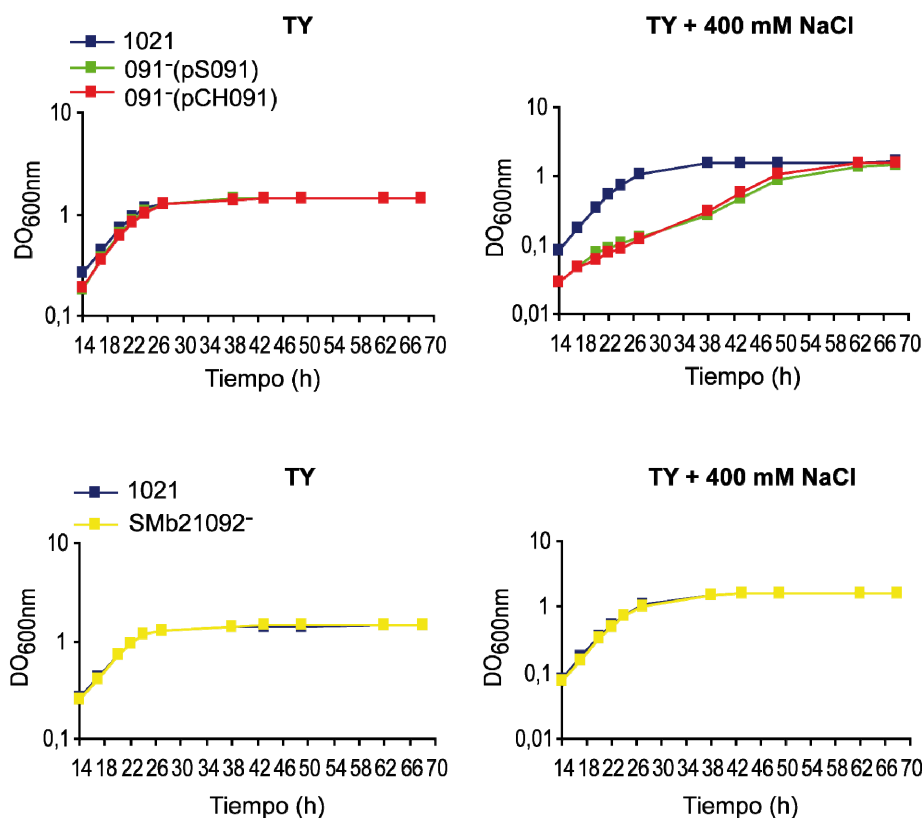


Figura 2.49. Curvas de crecimiento en TY adicionado de 400 mM de NaCl de los mutantes de *S. meliloti* 1021 en los genes SMb21091 (091⁻) y SMb21092 (092⁻).

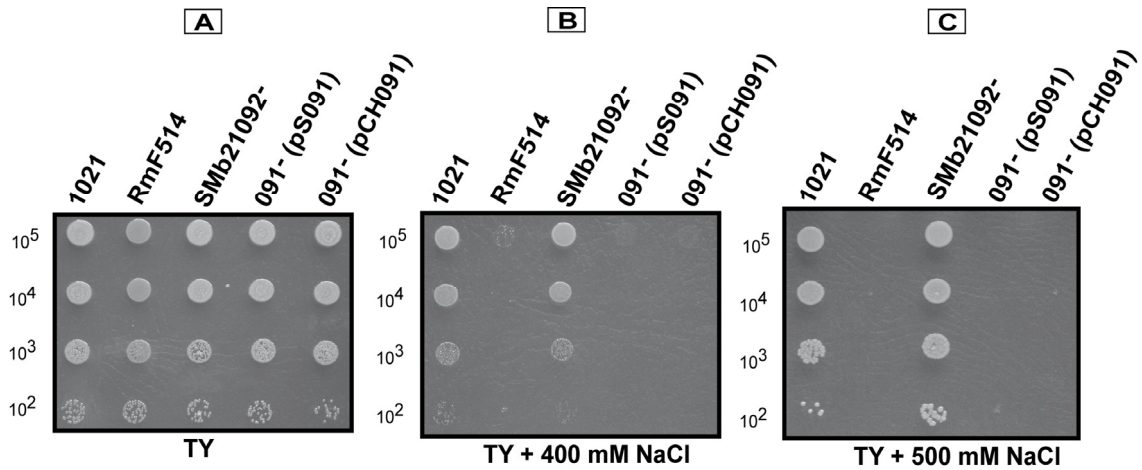


Figura 2.50. Crecimiento de las cepas 091⁻ y 092⁻ de *S. meliloti* en medio TY adicionado de 400 mM (B) y 500 mM de NaCl (C). En todas las placas se incluyeron como control la cepa parental *S. meliloti* 1021 y la cepa RmF514.

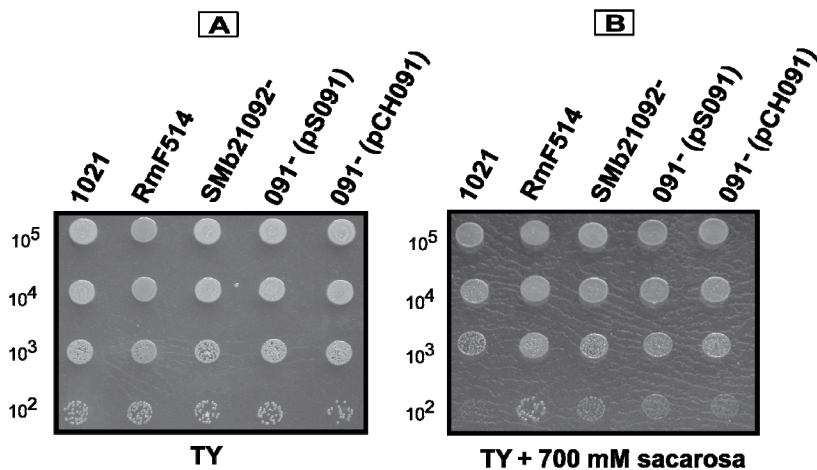


Figura 2.51. Crecimiento de las cepas 091⁻ y 092⁻ de *S. meliloti* en medio TY adicionado de 700 mM de sacarosa.

Para verificar que el fenotipo de los mutantes en el gen SMB21091 es provocado exclusivamente por la ausencia de función en este gen, fue necesario complementar dicha función en la cepa 091⁻, para lo cual se utilizó el plásmido pJB1,6. La presencia en *trans* del gen SMB21091 en la cepa 091⁻ recuperó el crecimiento de la misma en medio TY adicionado de 300 mM, 400 mM y 500 mM de NaCl (Figura 2.52).

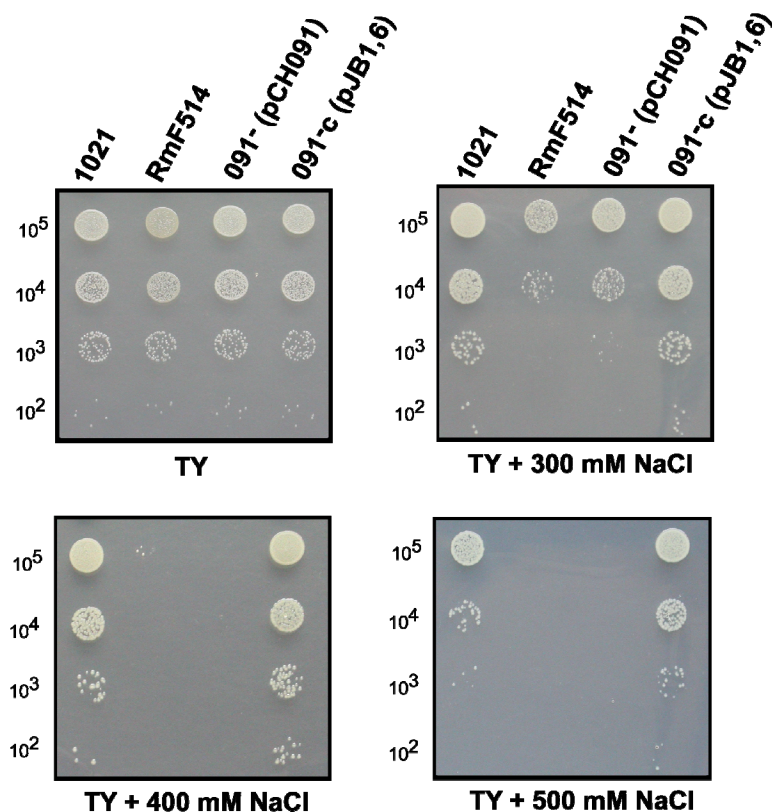


Figura 2.52. Recuperación del crecimiento de mutante 091⁻ (pCH091) en altas concentraciones de NaCl por la construcción pJB1,6.

Quedaba así demostrado que el gen SMb21091 juega un papel importante en la tolerancia a sal de la cepa 1021 de *S. meliloti*. A partir de este momento, denominaremos a este gen *satM* (de salt, acid, temperature tolerance).

6.3 Importancia del gen SMb21091 (*satM*) de *S. meliloti* 1021 para la tolerancia a otros estreses abióticos.

Dada la relevancia del gen *satM* para la tolerancia a sal de *S. meliloti*, se estudió además si este gen podía estar implicado en la tolerancia a otros estreses de tipo abiótico, determinando la capacidad de crecimiento de un mutante *satM* en condiciones de estrés iónico no osmótico, a temperaturas supraóptimas, pH ácido y alcalino, y estrés oxidativo.

Se estudió la capacidad de crecimiento del mutante en medio rico adicionado de distintas concentraciones de LiCl (Figura 2.53).

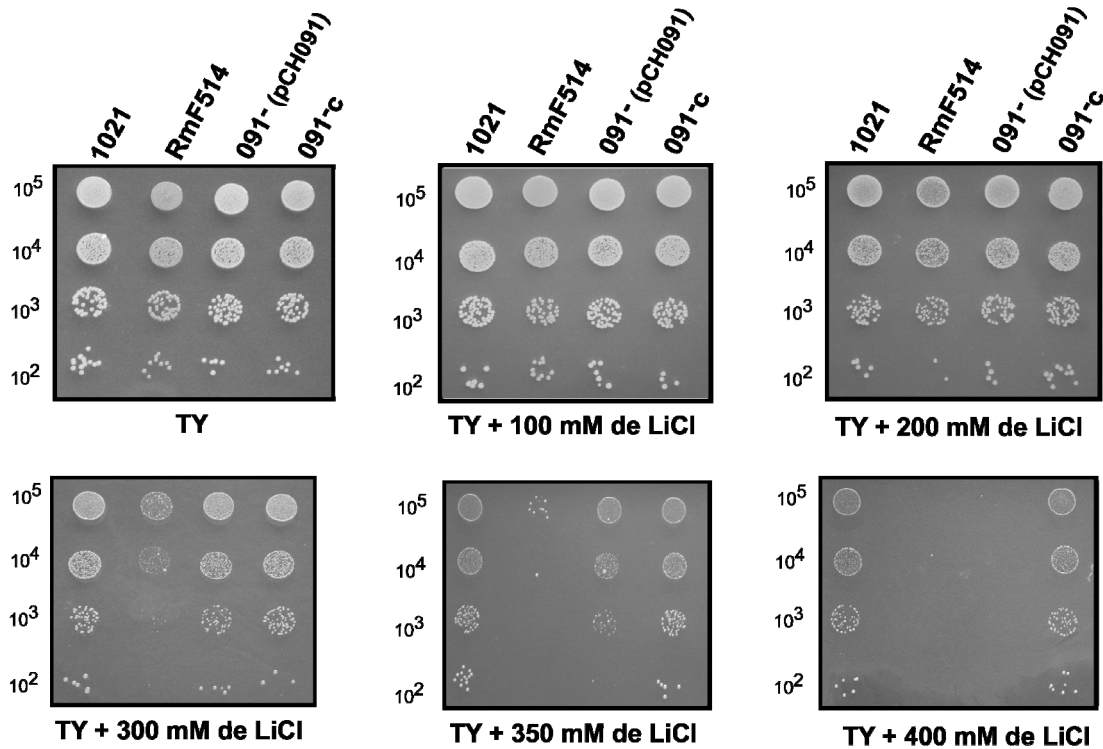


Figura 2.53. Crecimiento de cepas 091⁻ y 091^c de *S. meliloti* 1021 en TY adicionado de distintas concentraciones de LiCl.

Aunque el LiCl tiene un efecto más tóxico sobre los organismos que otros compuestos iónicos como el NaCl, es importante señalar la alta tolerancia de *S. meliloti* 1021 a este compuesto (Figura 2.53). La cepa 091⁻ mostró un incremento de sensibilidad al LiCl, recuperando los niveles de tolerancia de la cepa silvestre cuando se le introdujo un gen SMb21091 silvestre en *trans* (cepa 091^c).

Se estudió la capacidad de crecimiento de mutantes *satM* a temperaturas no óptimas. Para ello se realizaron dos tipos de ensayos sobre medio TY sólido; en uno se estudió el crecimiento a temperaturas supraóptimas, a 37°C, mientras que en el segundo se realizó a temperaturas de crecimiento infraóptimas, a 20°C. En la figura 2.54 se puede observar una disminución en la capacidad de crecimiento del mutante en el gen SMb21091 de *S. meliloti* a temperaturas no óptimas como a 37°C y 20°C. Este crecimiento volvió a recuperarlo con la presencia en *trans* del gen SMb21091 cepa 091^c, llegando incluso a mejorarlo con respecto a la cepa parental (1021).

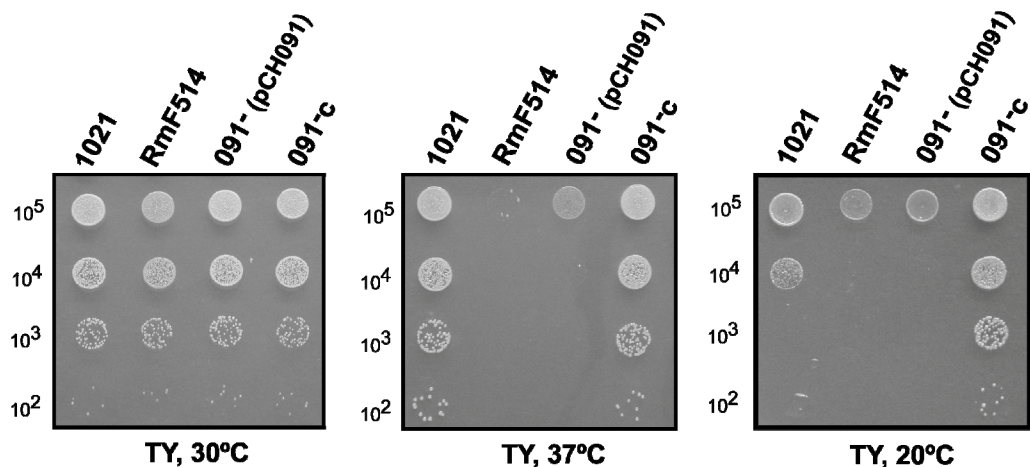


Figura 2.54. Crecimiento de las cepas 091⁻ (*satM*) y 091^c (complementada con *satM* en *trans*) de *S. meliloti* 1021 a temperaturas no óptimas.

Se determinó asimismo la capacidad de adaptación de un mutante *satM* sobre placas de TY tamponado con TRIS y MES (a una concentración final de 5 mM) hasta alcanzar en el medio un pH de 6 y 8 (Figura 2.55). Estos experimentos mostraron una disminución de la capacidad de crecimiento del mutante en el gen *satM* a pH 6, defecto que fue recuperado en el mutante complementado con *satM* en *trans*. Este mismo defecto también lo presentó la cepa RmF514. Por el contrario, a pH alcalino no hubo diferencias significativas en el crecimiento entre las cepas ensayadas.

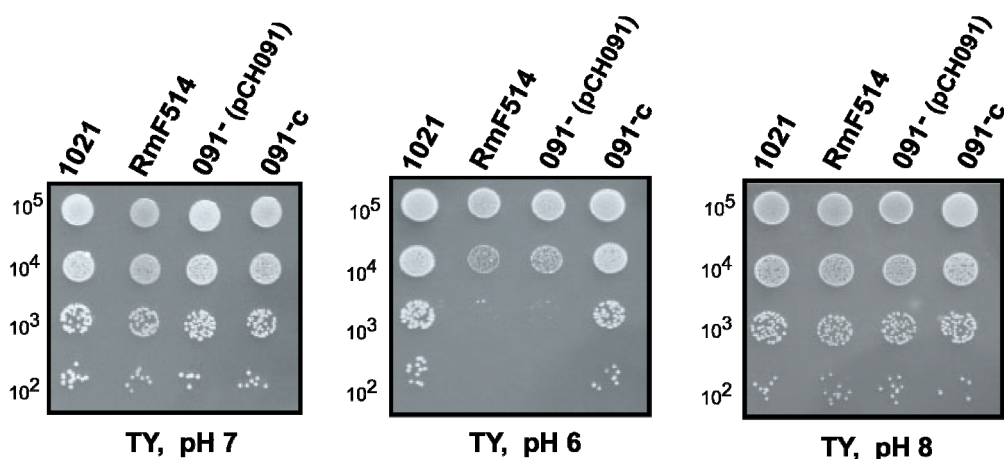


Figura 2.55. Crecimiento de las cepas 091⁻ y 091^c de *S. meliloti* 1021 en TY a pH ácido y alcalino.

Por último, para determinar los niveles de tolerancia a estrés oxidativo del mutante en el gen SMb21091, se estudió la inhibición del crecimiento por H₂O₂, cuantificando el tamaño del halo de inhibición del crecimiento en torno a una gota de 5 µl de H₂O₂. Se realizaron al menos 2 experimentos independientes y en cada uno se midió el diámetro del halo de inhibición de tres réplicas técnicas (o placas) para cada una de las cepas analizadas. En la figura 2.56 se muestra la media del diámetro del halo de inhibición.

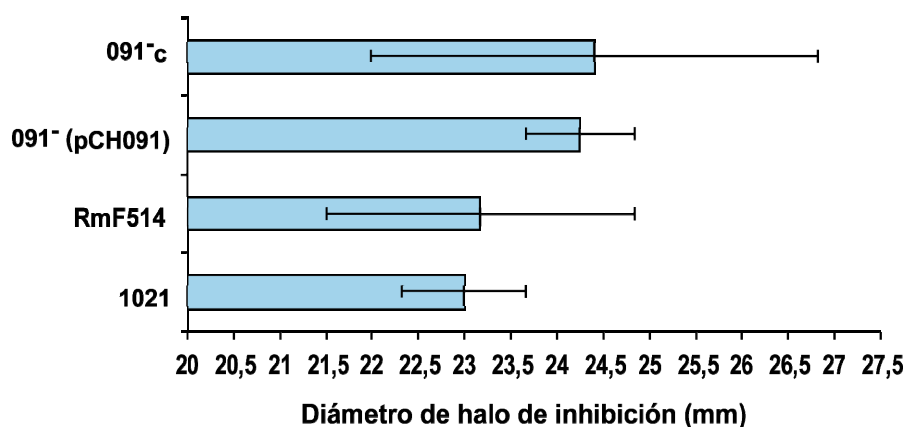


Figura 2.56. Sensibilidad del mutante 091⁻ y el mutante complementado (091⁻c) a H₂O₂.

Las barras de error de la figura 2.56 evidencian la enorme variabilidad observada con este tipo de ensayos. No se pudieron observar diferencias significativas en el diámetro de halo de inhibición del crecimiento por H₂O₂ entre las cepas ensayadas. Tanto el mutante en el gen *satM* como la cepa RmF514 fueron igual de sensibles al estrés por H₂O₂ que la cepa silvestre 1021.

7. PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN SMb21091 (*satM*) DE *S. meliloti* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.

Para estudiar la expresión del gen *satM* de *S. meliloti* se construyó una fusión transcripcional al gen *gus* (*uidA*), que se describe en el anexo 7 de este capítulo.

Se cuantificó la actividad β-glucuronidasa en la cepa 1021 (p53lysM) a lo largo de la curva de crecimiento en medio TY adicionado de 400 mM de NaCl desde el inicio del cultivo (Figura 2.57). En la expresión se incluye como control la curva de crecimiento sin NaCl añadido. Por otro lado, con el fin de reducir la variabilidad de las

medidas durante el crecimiento en fase estacionaria, se optó por expresar dicha actividad en nmoles de producto formado por minuto por mg de proteína total.

En la figura 2.57, se puede apreciar que la expresión del gen *satM* aumentó progresivamente a lo largo de la curva de crecimiento en medio no salino, pareciendo estabilizarse los niveles en la fase estacionaria del cultivo. El mismo perfil de expresión se observó durante el crecimiento en medio salino, si bien los niveles de expresión fueron siempre ligeramente inferiores a los determinados en el medio control.

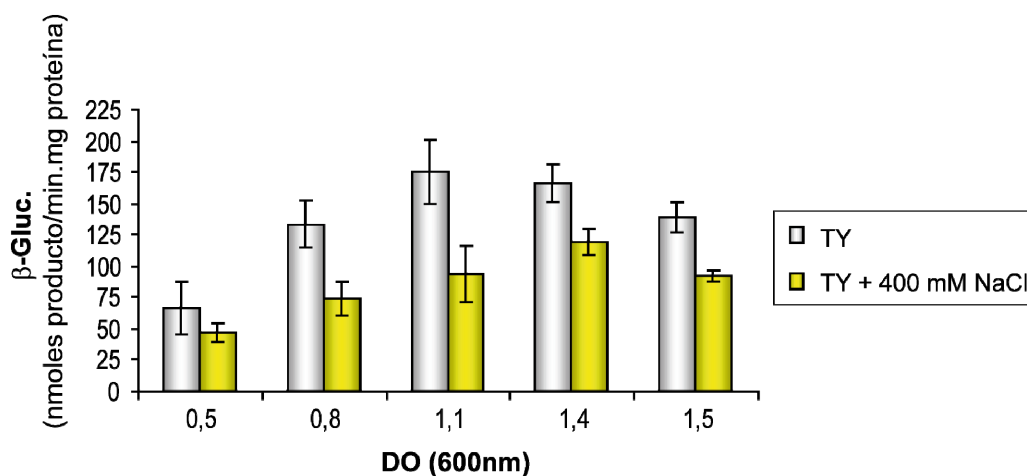


Figura 2.57. Expresión de la fusión transcripcional SMb21091::uidA (p53lysM) en *S. meliloti* 1021 a lo largo de la curva de crecimiento, en medio TY en presencia y ausencia de 400 mM de NaCl. Se muestra la actividad β -glucuronidasa en nmoles/min.mg de proteína y cada valor representa la media de 3 experimentos independientes. Las barras indican el error estándar.

8. DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES SMb21091 (*satM*) y SMb21092 DE *S. meliloti*.

La búsqueda de genes ortólogos en rizobios y otras especies bacterianas, no mostraron demasiada información acerca de las posibles funciones de los productos de los genes *satM* y SMb21092. No obstante, tras un examen detallado de la secuencia aminoacídica de estas proteínas, mediante programas de predicción de localización subcelular (www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/ y www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/analysis.shtml), se encontró que la secuencia de la proteína SatM podía contener un posible péptido señal típico de proteínas que son exportadas fuera del citoplasma. Este tipo de proteínas poseen en su extremo N-terminal una secuencia señal caracterizada por un dominio N polar, con aminoácidos

cargados positivamente, un dominio H hidrofóbico, con alto contenido en residuos de alanina y leucina y un tercer dominio C menos hidrofóbico (Figura 2.58). Este último contiene los residuos susceptibles de ser hidrolizados por peptidasas de tipo II durante el proceso de maduración de la lipoproteína. Esta clase de proteínas se caracterizan por poseer un residuo de cisteína en la posición +1 (Pugsley, 1993).

En la secuencia del producto de *satM* se puede identificar un posible péptido señal, además de un residuo de cisteína localizado en la posición +1 característico de las lipoproteínas (Figura 2.58). Estos datos indicaban que *satM* podría codificar para una posible lipoproteína que a su vez se secretaría al periplasma. Por el contrario, los programas de predicción indicaron que SMb21092 sería una proteína no asociada a ninguna estructura subcelular y por tanto sería de localización citoplásmica.

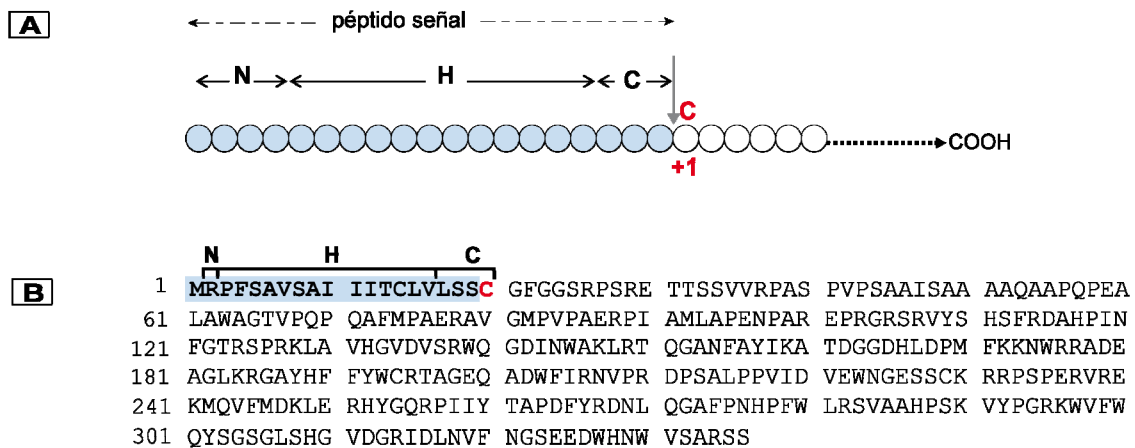


Figura 2.58. Representación esquemática de la secuencia del péptido señal en una lipoproteína, indicando la posición +1 (en rojo) que ocupa el residuo de cisteína y el sitio de procesamiento (flecha vertical) de la proteína por las peptidasas. En la figura B, se muestra la secuencia de la proteína codificada por el gen *satM* indicando su posible secuencia señal y dominios N, H y C (en azul) y el residuo de cisteína (C) en la posición +1, según la base de datos de www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/cgi/dolop/newlipo.cgi.

Para determinar empíricamente la localización subcelular de las proteínas de los genes SMb21091 y SMb21092 y así verificar los resultados de los análisis “in silico”, se construyeron las correspondientes fusiones traduccionales a la fosfatasa alcalina (PhoA) de *E. coli*. Esta proteína es un homodímero que posee dos puentes disulfuro intramoleculares en cada monómero, que son esenciales para que la enzima se pliegue en su conformación activa. Estos puentes disulfuro no se pueden formar habitualmente en el citoplasma, y en consecuencia la proteína se vuelve activa

sóloamente cuando se exporta a través de la membrana citoplasmática. Esta propiedad convierte a PhoA en un reportero de señales de exportación de proteínas, como secuencias señal procesables y segmentos transmembrana de proteínas de membrana interna orientados apropiadamente. Los clones que portan fusiones con PhoA activas son azules cuando se cultivan en medio sólido suplementado con 0,1 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP ó también llamado X-phos).

Se utilizaron los vectores pUCH218 (estable en enterobacterias pero no en rizobios) y pBBRphoA (estable en rizobios), con lo cual se construyeron 2 fusiones para cada uno de los genes de estudio. Las construcciones fueron transformadas y movilizadas a cepas de *E. coli* y *S. meliloti* carentes de actividad fosfatasa alcalina. Así, los plásmidos pUCHlysM, pUCH092 fueron transformados en la cepa CC118 de *E. coli* y las construcciones pBBRlysM y pBBR092 se movilizaron a la cepa Rm8002 de *S. meliloti*. Posteriormente, todas las cepas (incluyendo aquellas con los vectores vacíos como control) fueron sembradas en los medios correspondientes adicionados del sustrato X-phos a una concentración de 0,1 mM. La actividad PhoA se determinó cualitativamente, mediante la visualización de colonias de color azul (Figuras 2.59 y 60).

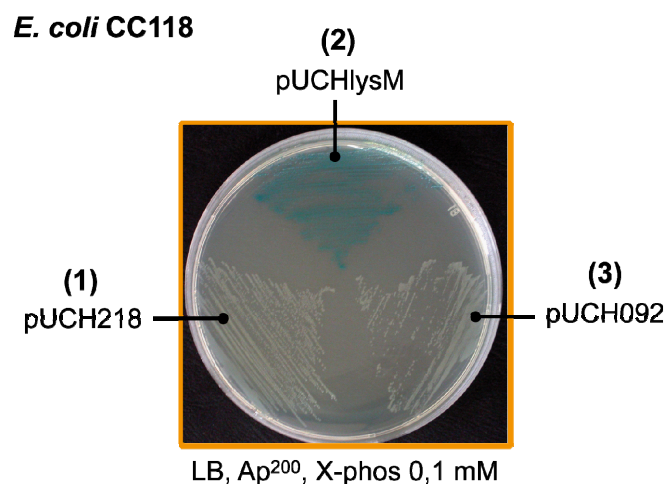


Figura 2.59. Actividad PhoA de la fusiones traduccionales pUCHlysM y pUCH092 en *E. coli* CC118.

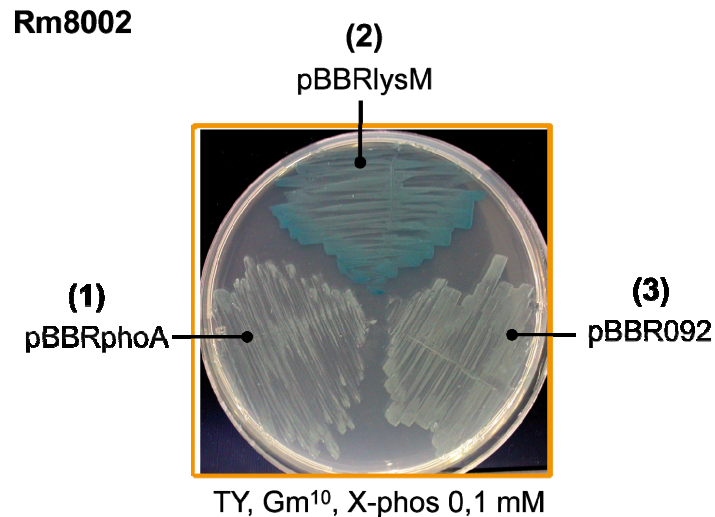


Figura 2.60. Actividad PhoA de las fusiones traduccionales pBBRlysM y pBBR092 en *S. meliloti* 8002.

Como se observa en las figuras 2.59 y 2.60, las cepas de *E. coli* y *S. meliloti* portadoras de las fusiones *satM-phoA* mostraron color azul en medio con X-Phos, indicativo de actividad fosfatasa alcalina. Estos resultados apoyaban la predicción de que la proteína SatM es exportada fuera del citoplasma celular. Por otro lado, las cepas que portaban las fusiones pertenecientes al gen SMb21092 no mostraron actividad fosfatasa alcalina, indicando que el producto de este gen es probablemente una proteína de localización citoplásmica.

9. CAPACIDAD DE NODULACIÓN DE MUTANTES EN LOS GENES *satM* Y SMb21092 DE *S. meliloti* EN RAICES DE ALFALFA.

Se llevaron a cabo experimentos de infectividad con mutantes *satM* y SMb21092 en plantas de alfalfa, en comparación con la cepa parental 1021, Las plantas fueron inoculadas con unas 10^6 ufc/ml y las cinéticas de nodulación que se obtuvieron se muestran en la figura 2.61. Todas las cepas fueron igualmente capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de plantas con alfalfa.

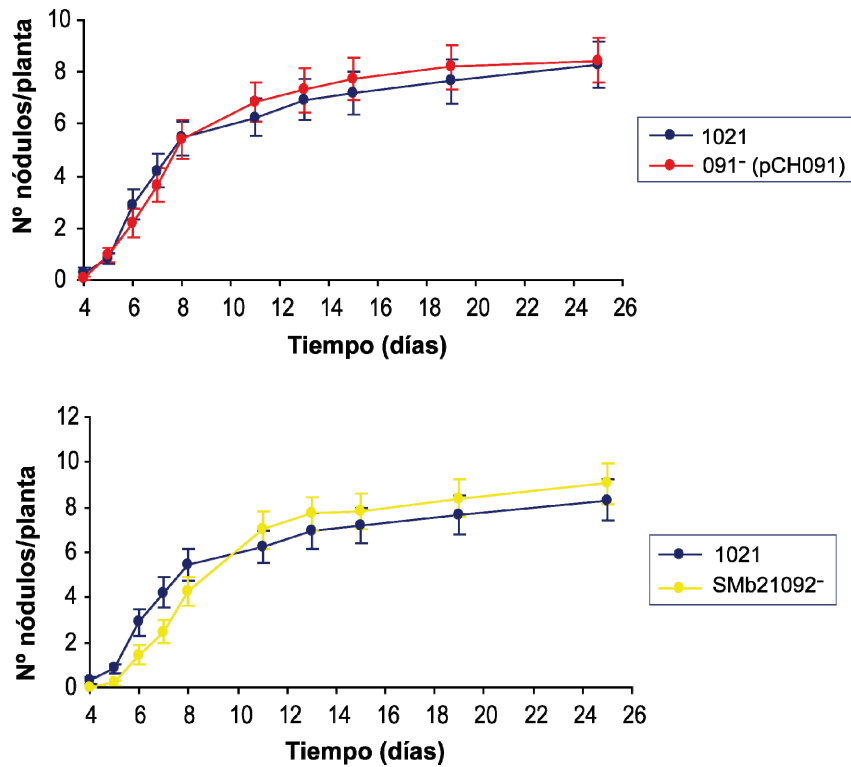


Figura 2.61. Cinéticas de nodulación de los mutantes *satM* (091⁻-pCH091) y SMb21092⁻ de *S. meliloti* 1021. En cada gráfica se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021. Cada punto es la media de 20 plantas y las barras asociadas corresponden al error estándar.

DISCUSIÓN: CAPÍTULO 2

La identificación y caracterización de genes implicados en nuevos mecanismos de osmoadaptación de *S. meliloti* en vida libre, así como su implicación en simbiosis, se inició a partir de los resultados previos de un estudio transcriptómico de *S. meliloti* 1021 en respuesta a un choque osmótico en vida libre (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). Estos experimentos permitieron identificar cientos de genes cuyos niveles de expresión cambia como consecuencia del estrés aplicado, encontrándose que la mayoría de los genes con expresión aumentada se localizaban en uno de los plásmidos simbióticos, pSymB, de esta bacteria. A raíz de estos datos, este trabajo se inició con la verificación de la expresión diferencial de algunos de dichos genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados obtenidos demostraron que por término medio, un 64% de los genes que aparecieron como osmorregulados en los experimentos con microarrays lo son realmente, y en concreto que los genes *otsA*, *rpoE5*, SMb20249 (*ino1*), SMb20345, SMb20347, SMb21406, SMb21044, SMb21448, SMb20537, SMb20651 y SMc02163 muestran cambios en su expresión tras un choque salino. Aunque no se pudo determinar la inducibilidad de los genes SMb20346 y SMb21407, el hecho de que éstos formen operones junto con los genes SMb20345, SMb20347 y SMb21406, respectivamente, en los que sí ha sido posible verificar su expresión por PCR cuantitativa, indica que es muy probable que también se induzcan en respuesta a un choque osmótico. Además, un reciente estudio transcriptómico de *S. meliloti* en respuesta a un choque a pH ácido reveló la inducción transitoria de los genes SMb20346 y SMb20347 (Hellweg *et al.*, 2009), lo que sugiere su implicación en la respuesta a este tipo de estrés abiótico. Relativo a los genes SMb21406 y SMb21407, que junto a otros dos genes cuyos productos proteicos serían homólogos a proteínas Ku bacterianas, han sido recientemente caracterizados por Kobayashi y colaboradores (2008). Estos autores descubrieron la existencia en *S. meliloti* 1021 de una ruta de reparación de ADN de cadena doble por recombinación no homóloga (NHEJ), en el que estarían involucradas 4 proteínas Ku y 6 proteínas de tipo LigD, que actuarían reparando el ADN en condiciones en las que su replicación está reducida o ausente. Los mismos autores detectaron expresión de SMb21406 y SMb21407 durante la fase crónica de la infección simbiótica, por lo que llegaron a sugerir que este sistema de reparación de ADN podría funcionar en los bacteroides.

A partir de los resultados de PCR cuantitativa, se llevó a cabo un estudio genético más detallado de los genes osmorregulados SMb20249 (*ino1*) y *rpoE5*, debido a su elevada inducibilidad tras un choque osmótico y al posible papel de sus productos en respuesta a estrés.

El gen *ino1* codifica para una posible 1-L-*mio*-inositol-1-fosfato sintasa (MIPS), que es la primera enzima que interviene en la ruta de síntesis del inositol y compuestos derivados en muchos organismos (Chen y Charalompous, 1964, 1965; Majumder *et al.*, 1997). Entre las diversas funciones asociadas al inositol destacan la termoprotección y, en menor medida, la osmoprotección en algunas especies de arqueas y bacterias termófilas (Martins y Santos, 1995; Martins *et al.*, 1997). También se ha demostrado que en *Saccharomyces cerevisiae* y *M. tuberculosis* el gen *ino1* es esencial para el crecimiento y virulencia de estos organismos (Culbertson y Henry, 1975; Movahedzadeh *et al.*, 2004). Los resultados de esta tesis indican que el gen *ino1* no es, por sí solo, importante para la osmoadaptación de *S. meliloti*, ni tampoco para el establecimiento de simbiosis efectivas con su planta hospedadora habitual, alfalfa. Aunque se desconoce si *S. meliloti* acumula inositol o algún compuesto derivado para la adaptación a estrés osmótico, es bastante probable que esta bacteria disponga de toda una maquinaria metabólica relacionada con este compuesto. Por un lado, en el genoma de *S. meliloti* 1021 han sido anotados 4 genes en el plásmido pSymB (SMb20150, SMb20159, SMb20362 y SMb21225) y otros 4 en el cromosoma (SMc00896, SMc00535, SMc03994 y SMc04042) que codifican para posibles proteínas con función inositol fosfato fosfatasa o inositol monofosfatasas. Resulta sorprendente que aproximadamente un 30% de las fosfatasas que aparecen anotadas en el genoma de esta bacteria estén relacionadas con la síntesis de inositol. Por otro lado, es probable que este compuesto pueda ser transportado y utilizado también como fuente de carbono y energía por esta bacteria, de modo similar a otros compuestos con carácter osmoprotector, como por ejemplo trehalosa o glicina betaína. La secuencia del genoma de *S. meliloti* revela la presencia de un conjunto de genes que codifican para un hipotético sistema de transporte de tipo ABC para inositol (SMb20072, *ibpA*, *iatA* y *iatP*), una inositol 2-deshidrogenasa (*IdhA*), así como los genes *iolB*, *iolE* e *iolR*, hipotéticamente implicados en el transporte y catabolismo de este compuesto. Por tanto, cabe la posibilidad de que este soluto tenga o haya tenido en algún momento a lo largo de la evolución de *S. meliloti* un papel activo en el funcionamiento, crecimiento y supervivencia de esta bacteria en condiciones especiales.

El gen *rpoE5* codifica para un factor transcripcional σ^E de función extracitoplásmica (ECF). *S. meliloti* 1021, al igual que otras especies de rizobios, posee varias copias del gen *rpoE*, 4 en el cromosoma y otras 2 localizadas en los plásmidos pSym. A pesar de la temprana y elevada inducción del gen *rpoE5* tras un choque osmótico (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006), verificada en esta tesis por la

técnica de PCR cuantitativa, mutantes en este gen muestran una capacidad de crecimiento en medios hiperosmóticos similar a la cepa silvestre. Probablemente sea muy difícil determinar el papel que desempeñan cada uno de los factores σ^E de *S. meliloti* en la respuesta a estreses ambientales, ya que de modo semejante a lo que ocurre en otras bacterias, como por ejemplo *Bacillus subtilis*, podrían tener funciones redundantes (Mascher *et al.*, 2007). No obstante, Sauviac y colaboradores (2007) tras un análisis transcriptómico de *S. meliloti*, han sugerido que el gen *rpoE2* es el mayor regulador de la respuesta a estrés general en esta bacteria. Entre los genes regulados por este factor de transcripción estarían los genes de respuesta a estrés *katC*, *rpoH2* y *rpoE5*. A pesar de estas observaciones, mutantes *rpoE2*⁻ no mostraron fenotipo ni en vida libre ni en simbiosis en comparación con la cepa parental. Estos resultados contrastan con los estudios realizados por Flechard y colaboradores (2009 y 2010). En primer lugar, demostraron que el gen *rpoE2* de *S. meliloti* es necesario para la producción durante fase estacionaria de crecimiento de las enzimas SOD y KatC, encargadas de prevenir la intoxicación por especies reactivas de oxígeno y H₂O₂. En segundo lugar, estos autores demostraron la importancia de RpoE2 en osmoadaptación. La construcción y caracterización de un mutante *rpoE2* de *S. meliloti* reveló un defecto en el crecimiento de la bacteria en medios hiperosmóticos, y sugiriendo que los problemas de crecimiento eran debidos a la ausencia de trehalosa. Por otro lado, aunque la expresión de las tres rutas de síntesis de trehalosa depende de RpoE2, es la ruta OtsA la que se más se induce por RpoE2 en condiciones hiperosmóticas. Los estudios sobre la actividad y regulación del factor RpoE2 has sido recientemente ampliados por Bastiat y colaboradores (2010).

Los resultados observados con los mutantes en los genes *ino1* y *rpoE5* de *S. meliloti* 1021 sugerían que no todos los genes con expresión aumentada tras un choque osmótico tienen necesariamente un papel relevante en el proceso de tolerancia a estrés osmótico, y que en todo caso, demostrar su vinculación con este proceso podía resultar dificultoso, particularmente cuando se trata de genes o funciones redundantes. Por tanto, fue necesario tener en cuenta otros datos surgidos a partir del estudio transcriptómico de *S. meliloti* (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006).

Cuando se analizó la distribución por replicones de los genes osmorregulados en dicho estudio transcriptómico, se observó que la mayoría de los genes reprimidos se localizaban en el cromosoma y la mayoría de los inducidos aparecieron localizados en los plásmidos simbióticos (pSyms) y de forma muy significativa en el plásmido pSymB. Se determinó la importancia de los plásmidos pSymA y pSymB en la osmoadaptación de *S. meliloti*. Los resultados del estudio de la capacidad de

crecimiento en vida libre en medios con elevada osmolaridad de la cepa A818 (curada del plásmido pSymA), indicaron que el plásmido pSymA no es necesario para la adaptación de esta bacteria al estrés salino. Este resultado permitió reducir la búsqueda para identificar nuevos genes relacionados con este proceso. Se decidió realizar un estudio genético dirigido a determinar la implicación del plásmido pSymB en la osmoadaptación de *S. meliloti*. Se sabe que el plásmido pSymB (1,68 Mb) de *S. meliloti* es esencial para esta bacteria y que no puede ser curada del mismo. Los estudios sobre la capacidad de crecimiento de cepas portadores de pSymB delecionados, en medios de elevada osmolaridad, mostraron deficiencias en el crecimiento de las cepas RmF909 y RmF514, en las que las regiones de pSymB faltantes son solapantes o parcialmente coincidentes. Estas cepas mutantes mostraron una disminuida capacidad de crecimiento en medio rico TY con altas concentraciones de NaCl en comparación a la cepa parental, lo que demostraba la implicación del plásmido simbiótico pSymB en la osmotolerancia de *S. meliloti*. Al mismo tiempo, los resultados sugerían que en dicha región de pSymB podrían localizarse uno o más genes importantes para la osmotolerancia de *S. meliloti*. No obstante, ambas cepas mostraron una infectividad y efectividad simbióticas similares a la cepa silvestre, lo que indicaba que las regiones de pSymB faltantes en ambas cepas no son importantes para el establecimiento de la simbiosis.

Los estudios de tolerancia a salinidad, los análisis “in silico” y la anotación en la base de datos de la secuencia genómica de *S. meliloti* 1021 permitieron identificar dicha región, con un tamaño aproximado de 200 Kb y conteniendo unos 198 genes. Una combinación de estos datos con los estudios de microarrays y los criterios previamente descritos en este trabajo, permitieron simplificar la búsqueda de nuevos genes objeto de este trabajo. Además, la disponibilidad de una colección de mutantes derivados de *S. meliloti* 2011 (Pobigaylo *et al.*, 2006) facilitaba *a priori* la realización de un estudio de estas características. De esta colección de mutantes portadores de mini Tn5-Gus pudimos disponer un grupo de 22 cepas cuya capacidad de crecimiento de en medios de elevada osmolaridad fue estudiada. Los resultados indicaron que 20 de los 22 mutantes ensayados tenían reducida su capacidad para crecer en medios con altas concentraciones de NaCl y/o sacarosa. Sin embargo, la inconsistencia de los resultados de tolerancia a sal en medio sólido y líquido puso en duda la fiabilidad de los mismos. El estudio de mutantes portadores de miniTn5 insertados en posiciones intergénicas, que teóricamente no afectan a la expresión de los ORF anotados, mostraron resultados similares, esto es, un 80% (4 de 5) de estas cepas mostraba también una capacidad disminuida de crecimiento en medios salinos, lo que sugería

que era la presencia del transposón, y no su localización en el genoma, la responsable de los fenotipos observados. Carecemos de una explicación para este hecho que en cualquier caso obligó a desechar todos los resultados relativos a estudios de osmotolerancia con los mutantes procedentes de la colección del grupo de la Dra. Anke Becker. Ante esta frustrante evidencia, se estudiaron otras alternativas para la identificación de nuevos genes con papel activo en la osmotolerancia de *S. meliloti*.

En la mayoría de trabajos previos, la estrategia utilizada para la búsqueda de nuevos genes implicados en osmoadaptación se ha basado en la obtención de mutaciones, por inserción aleatoria de transposones, que conllevan una pérdida de tolerancia al NaCl (Jiang *et al.*, 2004; Miller-Williams *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2004). En nuestro caso, se optó por una estrategia alternativa consistente en la complementación genética del fenotipo de la cepa RmF514 en medio salino, mediante el empleo de un banco de genes derivado de *S. meliloti* GR4. Los resultados obtenidos permitieron identificar una región génica con un tamaño de 7,6 Kb que contenía los genes SMb21088, SMb21089, SMb21090, SMb21091, SMb21092 y SMb21093. La clonación y subclonación de diversos fragmentos de este ADN y los sucesivos ensayos de complementación genética del fenotipo de la cepa RmF514, llevaron a identificar el operón formado por los genes SMb21091 y SMb21092. Se pudo determinar que el gen SMb21092 por sí sólo no recuperaba el crecimiento de RmF514 en medio salino, mientras que el gen SMb21091 sí lo hacía. Estos datos señalaron que la reducida tolerancia a salinidad de la cepa RmF514 era debida a la ausencia del gen SMb21091.

Los genes SMb21091 y SMb21092 fueron analizados y caracterizados genéticamente para verificar su importancia en la osmoadaptación de *S. meliloti*. Se observó que un mutante en SMb21092 de *S. meliloti* 1021 no mostraba diferencias de crecimiento en condiciones de estrés osmótico respecto a la cepa parental, lo que indicaba que SMb21092 por sí sólo no es necesario para la osmoadaptación de *S. meliloti*. Por el contrario, la inactivación del gen SMb21091 conllevaba una significativa reducción de la capacidad de crecimiento de la bacteria en medios con altas concentraciones de NaCl, un fenotipo semejante al mostrado por la cepa RmF514. Durante la caracterización fenotípica del mutante SMb21091 de *S. meliloti*, se determinó la importancia de este gen frente a otros tipos de estreses abióticos, particularmente para el crecimiento en medios suplementados con LiCl, a pH ligeramente ácido (pH 6) y para el crecimiento a temperaturas supra e infraóptimas. Sin embargo, los mutantes SMb21091 no mostraron problemas de crecimiento en medios con altas concentraciones de sacarosa (estrés osmótico no iónico), ni a pH

alcalino, ni en presencia de altas concentraciones de H₂O₂. Además, la complementación de la cepa mutante 091⁻ con un gen SMb21091 silvestre *en trans* provocó la recuperación del crecimiento en todas las situaciones y tipos de estreses. Dada la importancia de SMb21091 para el crecimiento de *S. meliloti* en medios con elevadas concentraciones salinas (NaCl y LiCl), pH ácido y a temperaturas no óptimas, este gen ha sido renombrado como *satM* (sal, acidity and temperature tolerance), en contraste con su anotación inicial como *lysM* en el genoma de *S. meliloti* 1021. Por otro lado, *satM* no parece estar implicado en el establecimiento de simbiosis con *Medicago sativa*, como lo demuestra el hecho de que los mutantes en este gen muestran una capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno similar a la cepa silvestre, similar a lo observado para el caso de la cepa RmF514 portadora de un pSymbB deletado que carece de *satM*.

Los estudios de expresión del gen *satM* de *S. meliloti* mostraron que este gen se transcribe a lo largo de toda la curva de crecimiento, tanto en condiciones no estresantes como en medios salinos, aunque a niveles diferentes dependiendo de las condiciones y la fase de crecimiento del cultivo. Mientras en medio TY la expresión aumenta durante la fase exponencial de crecimiento, los niveles caen de forma significativa tras la entrada en fase estacionaria. En medio TY suplementado con sal, los niveles de expresión de *satM* durante la fase exponencial son menores que en medio no salino, y del mismo modo que en las condiciones control, estos niveles disminuyen de forma considerable tras la entrada en fase estacionaria.

El gen *satM* codifica para una proteína de 336 aminoácidos de función desconocida. El análisis de la secuencia revela, no obstante, dos características importantes en dicha proteína: una secuencia de procesamiento por peptidasas (péptido señal) en el extremo N-terminal, característico de proteínas exportadas fuera del citoplasma, y un dominio glicosil hidrolasa GH25, dominio característico de muramidasa y lisozimas, que ocupa 2/3 de la proteína hacia el C-terminal. En consonancia con estos análisis "in silico", los experimentos de fusión con *phoA*, sugieren que *satM* codifica un producto que se exporta a través de la membrana interna y que probablemente se localice en el periplasma. No obstante, para verificar la localización subcelular de SatM, sería conveniente realizar experimentos adicionales, por ejemplo mediante fraccionamiento subcelular a partir de células de *S. meliloti* 1021 portadoras de los plásmidos pBBRlysM, que mediante análisis de "Western blot" de las diferentes fracciones y el empleo de un anticuerpo anti-PhoA, puede llegar a demostrar la presencia de la proteína de fusión en la fracción correspondiente de la célula.

Por otra parte, distintos programas de análisis bioinformático indican que SatM pertenece a la superfamilia de proteínas transglicosidasas, y particularmente a la familia de las 1,4-beta-N-acetylmuraminidasas (Superfamily Server). La posibilidad de que SatM sea una lipoproteína con actividad hidrolítica del peptidoglucano sugiere una posible función.

La lipoproteína de *E. coli* más estudiada es la denominada lipoproteína de la mureína o de Braun (Braun y Rehn, 1969), codificada por el gen *lpp*. Se piensa que la proteína se inserta en la cara interna de la membrana externa a través de esta región lipídica y que el resto de la proteína, hidrofílica y organizada en forma de hélice α , se sitúa en el periplasma. No es una proteína esencial, aunque se ha demostrado que es importante para mantener la integridad estructural de la pared celular, ya que los mutantes *lpp* liberan enzimas periplásmicos al medio externo, son más sensibles a diversos detergentes y otros agentes, y muestran evaginaciones a modo de burbujas en su membrana externa, a nivel del tabique de división (Fung *et al.*, 1978). Se ha sugerido que podría actuar en el mantenimiento del espacio periplásmico, a través de la unión de la membrana externa con el peptidoglucano.

La presencia de un péptido señal con una secuencia consenso de reconocimiento para la enzima peptidasa señal II, se considera, en muchas ocasiones, evidencia suficiente para definir una lipoproteína como tal. En nuestro caso, los únicos datos que poseemos acerca de esta supuesta lipoproteína codificada por *satM* parten de los programas bioinformáticos de predicción. Si quisiéramos conocer si el producto de *satM* es de naturaleza lipoproteica tendríamos que recurrir a criterios experimentales basados en la identificación de lipoproteínas bacterianas. Entre éstos están, por ejemplo, los ensayos de incorporación metabólica de compuestos marcados radiactivamente como [3H]glicerol o [3H]palmitato, o los de inhibición del procesamiento de la prolipoproteína mediante el uso del antibiótico peptídico cíclico globomicina, un inhibidor específico de la enzima peptidasa señal II, que es exclusiva para el procesamiento de lipoproteínas (Inukai *et al.*, 1978).

Por otro lado, las lisozimas (EC 3.2.1.17, también llamadas N-acetilmuramihidrolasas del peptidoglucano), son muramididasas que rompen los enlaces glicosídicos β -1,4 entre las unidades de N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG) presentes en el peptidoglucano, y que en consecuencia debilitan la pared (Figura 1). Son proteínas globulares constituidas por una sola cadena polipeptídica y de peso molecular comprendido en el rango de 14 a 30 KDa. La lisozima se encuentra en algunas secreciones animales como las lágrimas, la saliva y otros fluidos corporales, de modo que representa una importante barrera de defensa

contra las infecciones bacterianas. También la producen algunas bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) durante la fase estacionaria del crecimiento e interviene en los procesos de autólisis de estos organismos.

La forma más caracterizada y estudiada es la lisozima de la clara de huevo de gallina, que se emplea para degradar el esqueleto polisacárido del peptidoglicano de algunas bacterias Gram-positivas como *Micrococcus lysodeikticus* (*M. luteus*). Este organismo se utiliza frecuentemente como un “medidor de lisis” en la valoración de actividad biológica de preparados de lisozima (Hash, 1967; Jollès y Jollès, 1984).

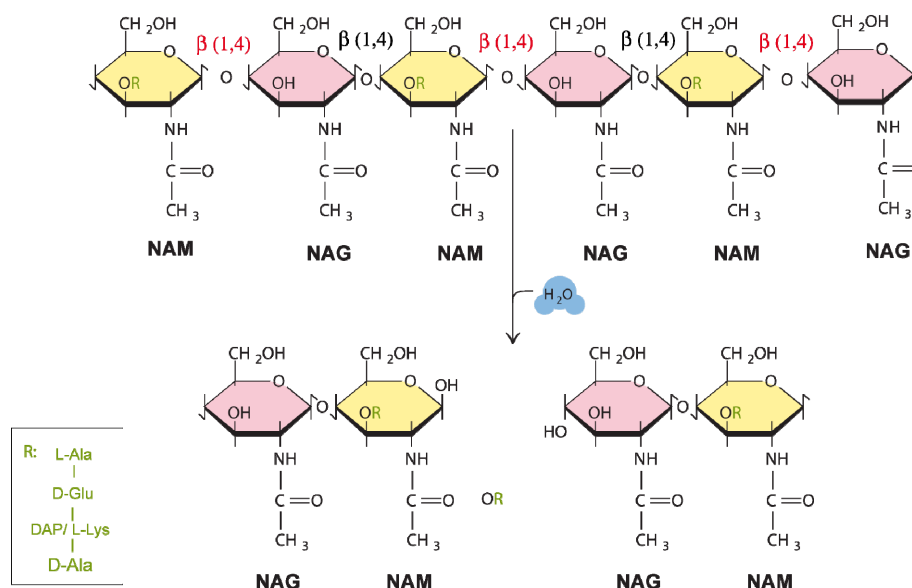


Figura 2.62. Actividad de la lisozima sobre el peptidoglicano bacteriano.

Además de la presencia de estas proteínas, existen en la pared bacteriana numerosas clases de hidrolasas de mureína que funcionan principalmente en el mantenimiento de la integridad y plasticidad de la pared celular durante el crecimiento y división de la célula. Cuando una célula se alarga antes de la división celular, se sintetiza pared celular de novo. Este nuevo material debe añadirse a la pared celular preexistente sin pérdida de la integridad estructural. En la zona de división celular se abren pequeños huecos en la pared que son creados por enzimas llamadas autolisinas. Entre éstas, destacan proteínas amidasas, peptidasas y las transglicosilasas líticas (Höltje, 1995). Estas últimas representan una importante clase de enzimas bacterianas que actúan en el peptidoglicano con la misma especificidad por el sustrato que las lisozimas. Las transglicosilasas líticas, a diferencia de las lisozimas, rompen el enlace β-1,4 glicosídico entre el ácido NAM y NAG dando lugar a un nuevo

compuesto denominado ácido 1,6-anhidromurámico (Figura 2). Esta clase de autolisinas están encargadas de crear espacios dentro del peptidoglicano para la biosíntesis, reciclaje, división celular y la inserción en la envoltura de sistemas de macromoléculas como por ejemplo los flagelos y los sistemas de secreción. *E. coli*, produce al menos 6 transglicosilasas líticas, algunas solubles y otras unidas a la membrana. Entre las más estudiadas están las transglicosilasas líticas Slt70, MltA y MltB, estas dos últimas son lipoproteínas que se localizan en la membrana externa. Se sabe que mutantes en genes de estas proteínas no son esenciales para el crecimiento y división bacteriana, aunque poseen efectos drásticos en la composición de residuos y estructura del peptidoglucano (Blackburn y Clarke, 2001; Heidrich *et al.*, 2002; Lommatzsch *et al.*, 1997; Scheurwater *et al.*, 2007).

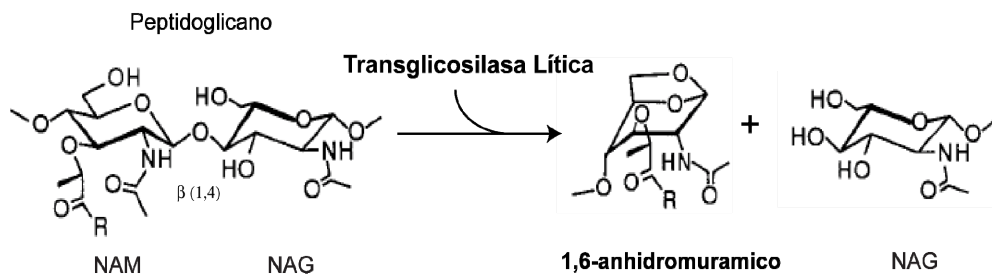


Figura 2.63. Reacción enzimática catalizada por una transglicosilasa lítica. Formación del ácido 1,6-anhidromurámico.

Se sabe que las células bacterianas se encuentran en una situación de riesgo osmótico permanente. La alta concentración de los solutos intracelulares crea una gran presión osmótica que llevaría a las células a estallar si no contaran con una cubierta de protección. La membrana citoplasmática no es capaz de soportar por sí sola la presión de turgor (debida a la presión osmótica) del citoplasma bacteriano. El elemento de resistencia mecánica de las células bacterianas es la capa del peptidoglicano, que les confiere además la morfología característica de los diferentes grupos bacterianos.

Por último, se ha descrito que las células bacterianas remodelan su pared celular al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, en respuesta a estrés osmótico, durante la infección de fagos, la adhesión a superficies y la entrada en células hospedadoras (Stokes, 2003; Arisaka *et al.*, 2003; Quintela *et al.*, 1997). También se sabe que algunos microorganismos modifican la composición de su envoltura celular en respuesta a otros estreses abióticos como son los cambios en el pH externo y la

temperatura (Booth, 1985). En *S. meliloti*, el gen *satM* codificaría para una proteína con una posible función en la envoltura celular, que estaría desempeñando un papel muy importante en la adaptación a distintos tipos de estreses abióticos. Por tanto, es probable que las proteínas codificadas por el operón *satM*/SMb21092 modifiquen la composición del peptidoglicano para el mantenimiento de la envoltura celular y, en especial, durante el proceso de adaptación de la bacteria a condiciones de estrés. La disminución del crecimiento observada en la bacteria en estas condiciones podría explicarse por un defecto en la plasticidad de la pared celular provocada por la ausencia de la proteína *SatM*. No obstante, sería necesario recurrir a técnicas bioquímicas y microscópicas para poder verificar tanto la actividad de la proteína codificada por el gen *satM* como la influencia de este gen en la estructura de la pared celular o la morfología celular de *S. meliloti*.

ANEXOS: CAPÍTULO 2

Anexo 1. Construcción de un mutante en el gen SMb20249 de *S. meliloti* 1021.

La obtención del mutante en el gen SMb20249 se realizó mediante intercambio alélico sobre el genoma de *S. meliloti* 1021. Se amplificó, a partir del genoma de la cepa 1021, un fragmento de 2,8 Kb (Figura 2.64) que contenía el gen SMb20249, mediante el uso de los oligonucleótidos:

INO1(1)	5'- taaggatcc CCTTGACGAGCTTTCGCTG-3' BamHI
INO1(2)	5'- taaggatcc GATGTGACAGACCAGGGTTT-3' BamHI

El amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega) (Figura II.62C), generándose el plásmido pGINO1 (Figura 2.64A). A continuación, se eliminó un fragmento *EcoRV* interno al gen SMb20249 y en su lugar se insertó un cassette de resistencia a Sm/Spc, previamente digerido con *SmaI* a partir del vector pHP45ΩSm-Spc, dando lugar al plásmido pGINOSS (Figura 2.64B). Este último fue digerido con *NotI*, obteniéndose un fragmento de 4,6 Kb que se purificó y se clonó en el vector suicida pSUP202pol4 (Simon *et al*, 1983) (Figura 2.64C) para dar lugar a un nuevo plásmido, pSINOSS (Figura 2.64B), que se movilizó posteriormente mediante una conjugación biparental desde una cepa donadora S17.1 de *E. coli* hasta la cepa receptora 1021 de *S. meliloti*. Al tratarse de un vector que no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, entre los transconjugantes resultantes se seleccionaron aquellos que fueron Sm/Spc resistentes y tetraciclina sensibles, en los que se habría producido el intercambio alélico como consecuencia de la doble recombinación homóloga. Finalmente, se escogieron un conjunto de diez posibles mutantes que se comprobaron por hibridación (Figura 2.65.3) frente al ADN del gen SMb20249. Se utilizó el ADN genómico de estos transconjugantes (junto con el ADN de la cepa parental 1021) digerido con *EcoRI* para hibridarlo (como sonda). La sonda marcada consistió en dos bandas purificadas *EcoRI* procedentes del plásmido pGINO1 que hibridan con los fragmentos *EcoRI* del genoma de *S. meliloti* 1021 de 1 y 1,2 Kb de tamaño (Figura 2.65.1). La inserción del cassette de Sm-Spc dentro del gen SMb20249 provoca que una de las bandas de ADN de 1 Kb pase a tener un tamaño de 2,8 Kb en las cepas mutantes (Figura 2.65.2 y 3).

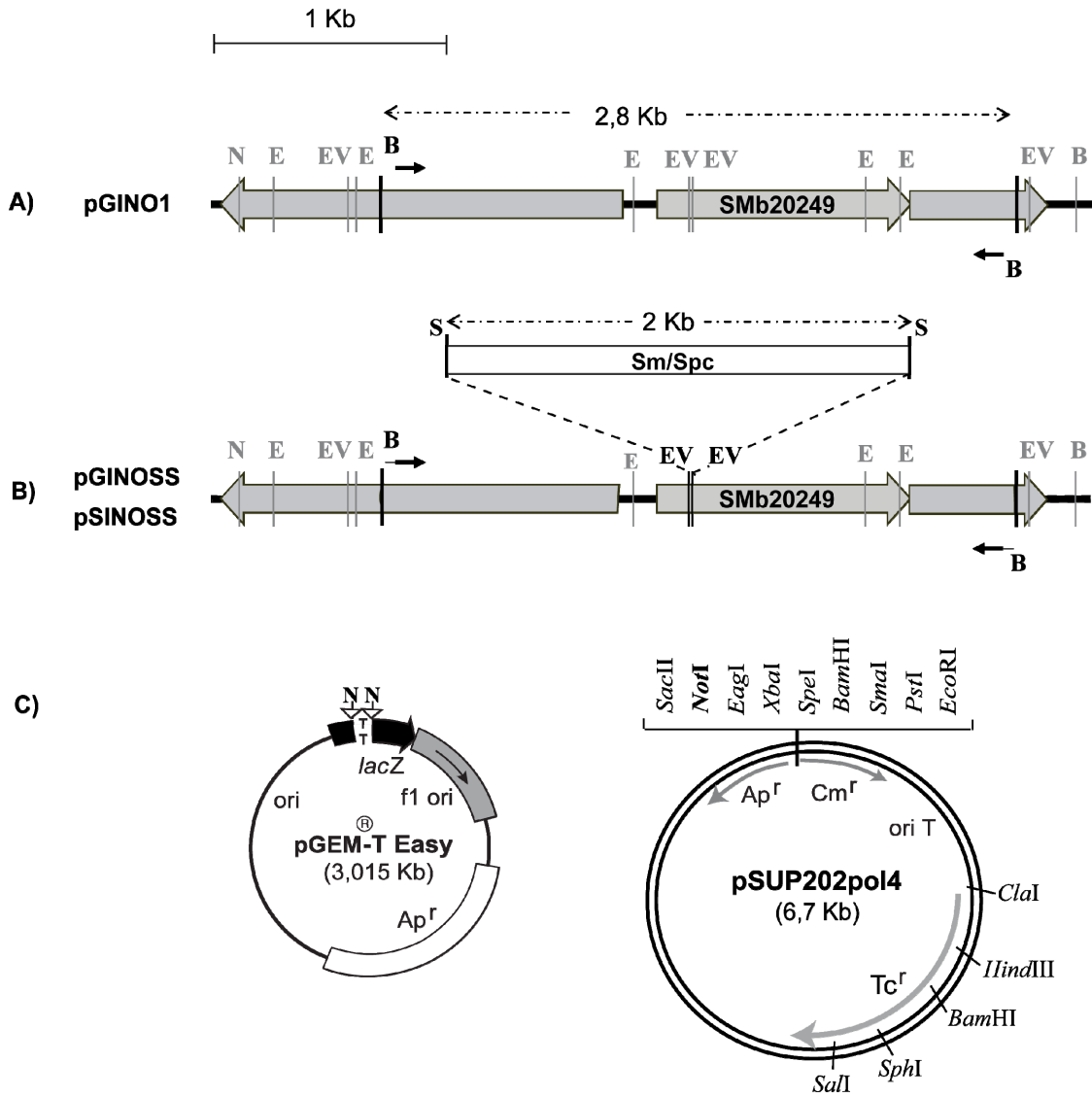
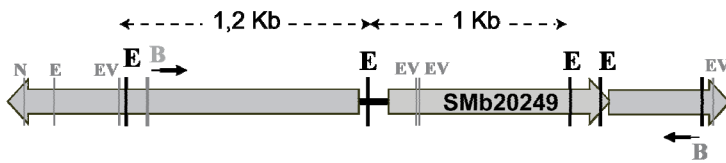
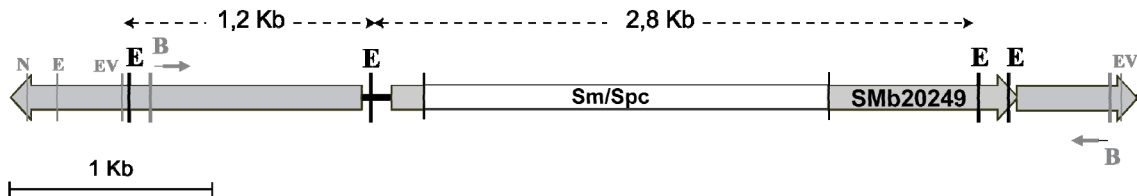


Figura 2.64. Representación esquemática de la construcción del mutante en el gen SMB20249 de *S. meliloti* 1021. Se muestran los mapas de los vectores de clonación pGEM[®]-T Easy y pSUP202pol4 (c). **N;** NotI, **E;** EcoRI, **EV;** EcoRV, **S;** SmaI, **B;** BamHI.

1) 1021



2) 1021 (*ino1*-)



3)

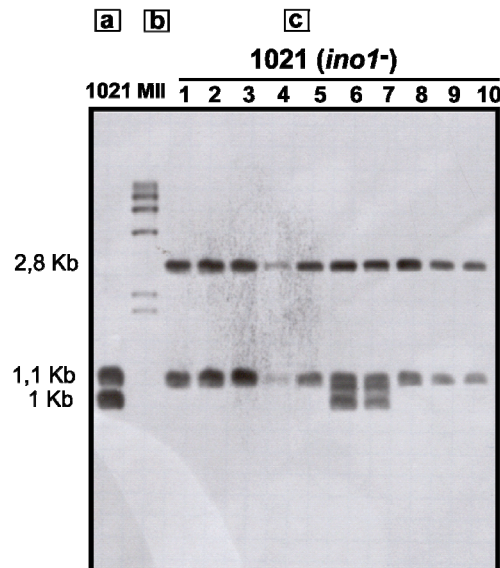
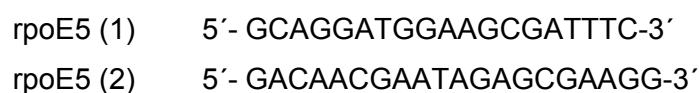


Figura 2.65. Comprobación de mutaciones en el gen SMb20249 de *S. meliloti* 1021. Hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* frente al amplificado de la región usado como sonda. **a**, cepa parental 1021; **b**, marcador (MII); **c**, transconjugantes mutantes (1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, y 10) y transconjugantes no mutantes (6 y 7).

Anexo 2. Construcción de un mutante en el gen *rpoE5* de *S. meliloti* 1021.

El primer paso fue la amplificación de un fragmento de 2,2 Kb que contenía el gen SMb21484, a partir de ADN genómico de la cepa parental 1021 (Figura 2.66A), usando los oligonucleótidos siguientes:



El amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGrp*oE5* (Figura 2.66A). Posteriormente, se insertó en el sitio *Sma*I del gen un cassette (de 2 Kb) de resistencia a Sm/Spc, purificado a partir del plásmido pHP45ΩSm-Spc, formándose el plásmido pGE5-SS (Figura 2.66B), con un tamaño de 7,2 Kb. A continuación, se hizo una digestión *Eco*RI de este plásmido y se obtuvo un fragmento de 4,2 Kb que se clonó mediante una ligación de extremos romos sobre el plásmido pSup202pol4, dando lugar al plásmido pSE5-SS (Figura 2.66B) que se movilizó mediante una conjugación biparental desde la cepa donadora S17.1 de *E. coli* hasta la cepa receptora 1021 de *S. meliloti*. Tras el cruce, se seleccionaron los transconjugantes que fueron Sm-Spc resistentes y tetraciclina sensibles, que son aquellos teóricos derivados de 1021 en los que ha tenido lugar el intercambio alélico por recombinación homóloga. De todos estos, se eligieron tres y se comprobaron por la técnica de hibridación utilizando ADN genómico digerido con *Xho*I. El fragmento marcado con digoxigenina y utilizado como sonda para hibridar con el ADN genómico tenía un tamaño de 1,86 Kb (Figura 2.67) y se obtuvo a partir de la digestión *Eco*RI/*Xho*I de pGrp*oE5*. La inserción del cassette de Sm-Spc dentro del gen *rpoE5* provocó que la banda de ADN de 2,6 Kb pasara a tener un tamaño de 4,6 Kb en las cepas mutantes (Figura 2.67).

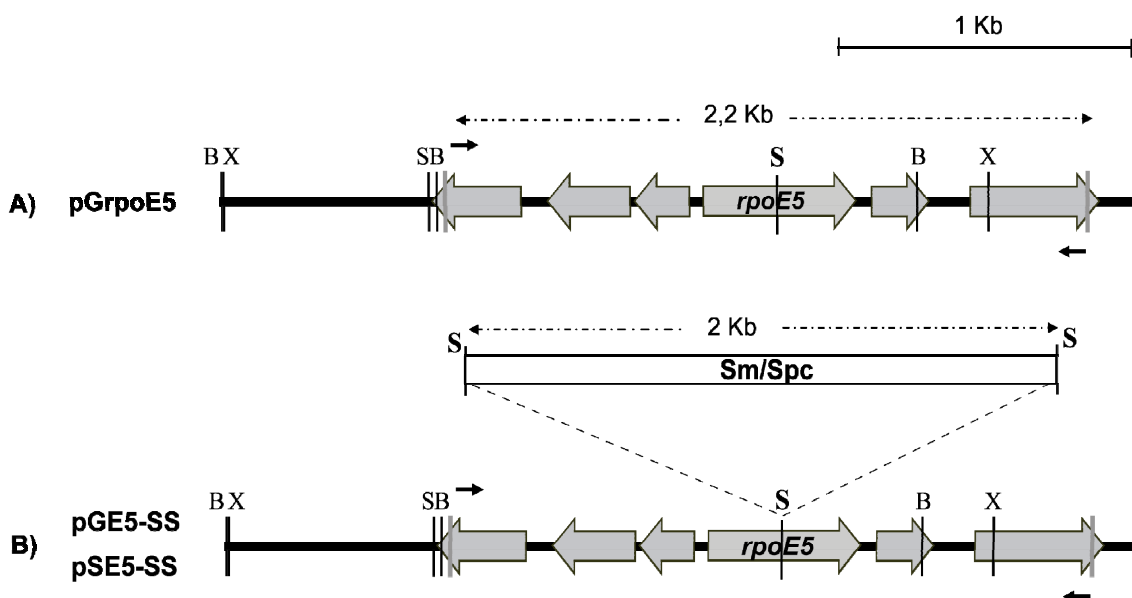


Figura 2.66. Representación esquemática de la construcción del mutante *rpoE5* de *S. meliloti* 1021 mediante la inserción (en el sitio *Sma*I) de un cassette de resistencia a Sm-Spc. **E**; *Eco*RI, **S**; *Sma*I, **B**; *Bam*HI, **X**; *Xho*I.

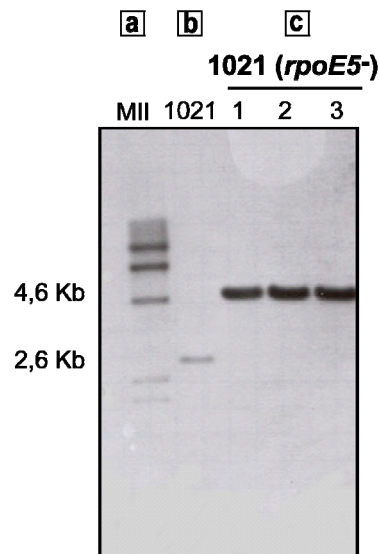


Figura 2.67. Comprobación de la mutación de *rpoE5* de *S. meliloti* 1021. Hibridación del ADN genómico digerido con *XhoI* frente al amplificado de la región utilizado como sonda. **S**; *SmaI*, **X**; *XhoI*. **a**; Marcador (MII); **b**; Cepa parental 1021, **c**; Transconjugantes mutantes (1, 2 y 3).

Anexo 3. Construcción de los plásmidos pJB7,6-1, pJB7,6-2, pJB5,2 y pJB3,1.

Para la construcción de estos plásmidos se partió del fragmento *EcoRI* de 7,6 Kb procedente del cósmido cos15, que se clonó en el sitio *EcoRI* del vector pUC18 en las dos orientaciones posibles, dando lugar a las construcciones pUC7,6-1 y pUC7,6-2, respectivamente. Posteriormente, se tomó el inserto de 7,6 Kb del plásmido pUC7,6-1 y se clonó en el sitio *EcoRI* del plásmido pJB3Tc19 en las dos orientaciones posibles, obteniéndose así las construcciones pJB7,6-1 y pJB7,6-2 de un tamaño de 14,67 Kb (Figura 2.68).

Para la obtención del clon pJB5,2 de 12,3 Kb se clonó un fragmento *KpnI* de 5,2 Kb proveniente del plásmido pJB7,6-1 en el vector pJB3Tc19 (Figura 2.68). La construcción pJB3,1 fue obtenida tras la ligación a pJB3Tc19 de un fragmento *SacI* de 3,1 Kb procedente del clon pUC7,6-1 (Figura 2.68).

Todas las construcciones fueron transferidas a las cepas RmF514 y RmF909 mediante conjugación biparental y empleando la cepa S17.1 de *E. coli* como donadora.

En la figura 2.68b se representa el mapa físico de los vectores de clonación pUC18 y pJB3Tc19.

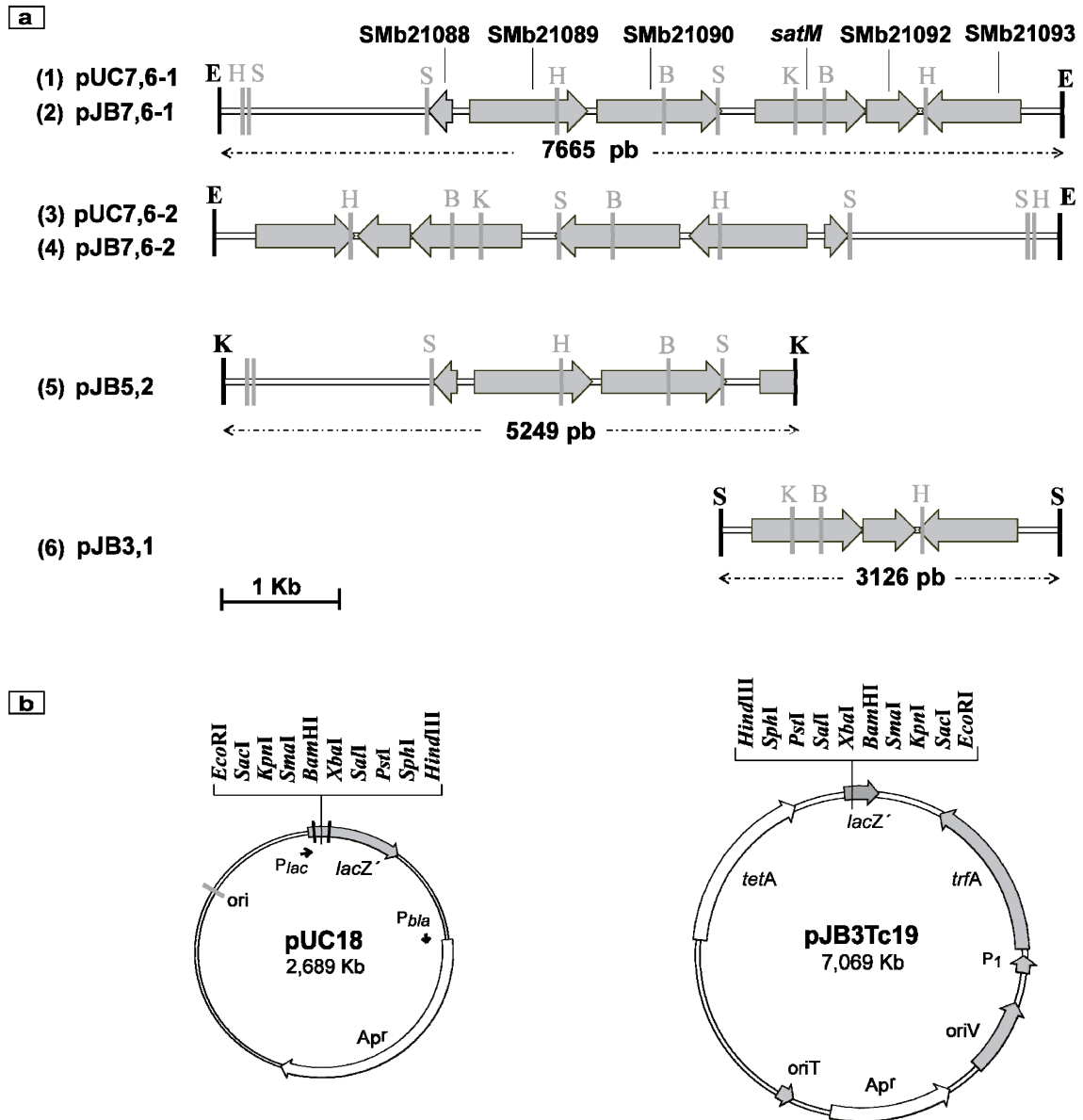
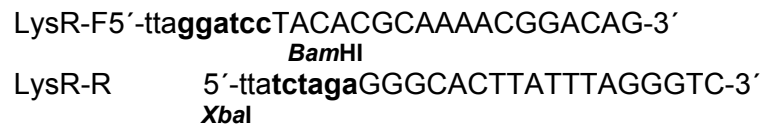


Figura 2.68. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pJB7,6-1, pJB7,6-2, pJB5,2 y pJB3,1. **a;** Fragmentos que fueron clonados y subclonados en los vectores pUC18 y pJB3Tc19. **b;** Mapas físicos de los vectores de clonación. **E;** *EcoRI*, **S;** *SacI*, **K;** *KpnI*, **B;** *BamHI*, **H;** *HindIII*.

Anexo 4. Construcción de los clones pJB1,89, pJBlysR, ΔpJB1,89 y pJB1,6.

El clon pJB1,89 fue construido mediante la subclonación de un fragmento *HindIII* de 1,89 Kb en el vector pJB3Tc19 a partir del plásmido pJB3,1 (Figura 2.69).

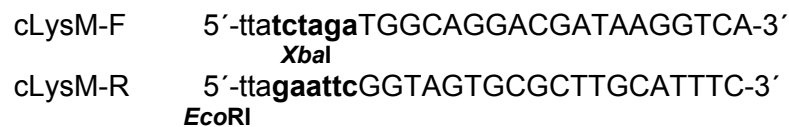
Para la obtención del clon pJBlysR se tuvo que amplificar un fragmento de 1079 pb a partir de ADN genómico de *S. meliloti* 1021 que contenía al gen SMb21093. Los oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación fueron los siguientes:



El producto de PCR se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGlysR. Posteriormente, el fragmento *Bam*HI/*Xba*I de 1 Kb de pGlysR se clonó en el vector pJB3Tc19, obteniéndose la construcción pJBlysR (Figura 2.69).

El plásmido ΔpJB1,89 se obtuvo a partir del plásmido pJB1,89 en el cual se delecionaron 163 pb utilizando los sitios *Not*I localizados en la región de 1,89 Kb (Figura 2.69). La delección produjo una mutación no polar en el gen *lysM* del plásmido pJB1,89 de modo que la expresión del gen SMb21092 no quedaba afectada.

Para obtener el plásmido pJB1,6 se amplificó a partir del ADN genómico de *S. meliloti* 1021 un fragmento de ADN de 1629 pb que fue posteriormente clonado en el vector pGEM[®]-T Easy, dando lugar a la construcción pG1,6lysM. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:



A continuación, el fragmento *Xba*I/*Eco*RI de 1,6 Kb procedente del plásmido pG1,6lysM se clonó en el vector pJB3Tc19 obteniéndose la construcción pJB1,6 (Figura 2.69).

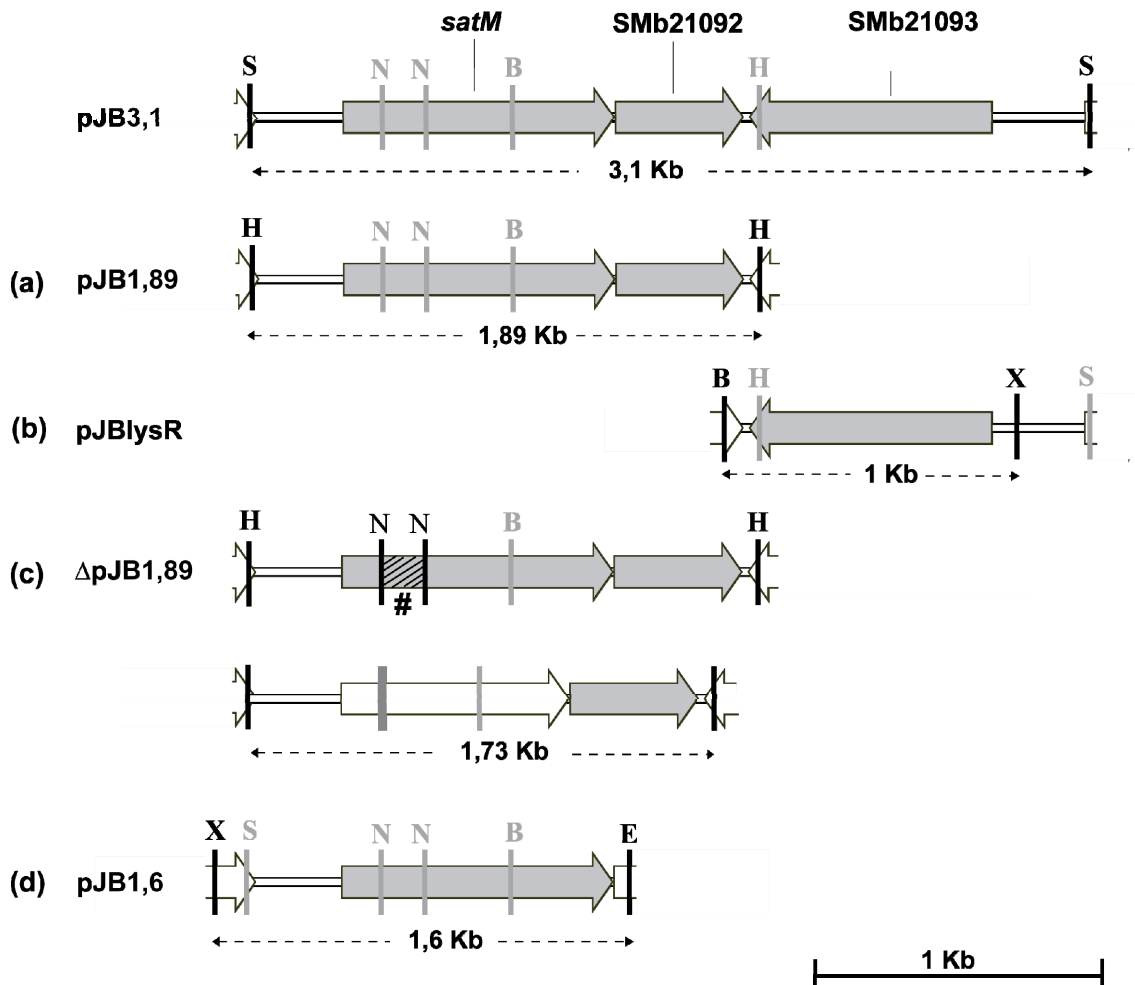


Figura 2.69. Representación esquemática de los clones pJB1,89 (a), pJBlysR (b), ΔpJB1,89 (c) y pJB1,6 (d). En la parte inferior de cada región génica se muestra el tamaño (en Kb) de cada una de las regiones clonadas en el vector pJB3Tc19. El asterisco (#) indica la región delecionada entre los sitios *NotI* que dio lugar al plásmido ΔpJB1,89 (c). **N**; *NotI*, **S**; *SacI*, **H**; *HindIII*, **B**; *BamHI*, **X**; *XbaI*, **E**; *EcoRI*.

Anexo 5. Construcción de mutantes en el gen SMb21091 (*satM*) de *S. meliloti* 1021.

Los mutantes en el gen *satM* se obtuvieron por simple recombinación homóloga mediante la integración simple de vectores que no pueden replicarse en el fondo genético de *S. meliloti*. Se construyeron dos mutantes diferentes utilizando dos vectores distintos.

5.1. Obtención del mutante 091⁻ a partir del plásmido pCHESI-zKm.

Se amplificó a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021 un fragmento de 412 pb (412 + 18 pb incluyendo el tamaño total de los cebadores). El inserto correspondía a la parte interna de la secuencia del gen anotado como *lysM* (SMb21091) en el genoma de esta bacteria (Figura 2.70A). Los oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación fueron los siguientes.

091-F 5'-ttaggattcGCGATGCTCATCCGATCAAT-3'
EcoRI
 091-R 5'-ttatctagaCGCTCCAGCTTGTCCATAAA-3'
XbaI

El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pG091(SI). Un fragmento *EcoRI* de 412 pb de este plásmido se clonó en orientación *EcoRI-XbaI* en el vector pCHESI-zKm (Figura 2.70B) obteniéndose la construcción pCH091. Este plásmido se movilizó desde la cepa S.17.1 de *E. coli* hasta la cepa 1021 de *S. meliloti* para obtener finalmente el mutante 091⁻ (pCH091). Al tratarse de un vector suicida, incapaz de replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, se pudieron seleccionar transconjugantes resistentes a Km en los que se había producido la integración del plásmido pCH091, mediante recombinación homóloga mediada por el fragmento de 412 pb interno a *satM*.

La mutación se verificó en varios transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *XhoI* y utilizando como sonda el inserto amplificado de 412 pb marcado con digoxigenina. Esta sonda hibrida con un fragmento de 1,4 Kb del genoma de *S. meliloti* 1021 que por efecto de la integración del plásmido pCH091 pasa a ser de 7,5 Kb (Figura 2.71). Todos los transconjugantes analizados resultaron tener la mutación y en la figura 2.71 se muestra una representación de ellos (4, 7, y 8).

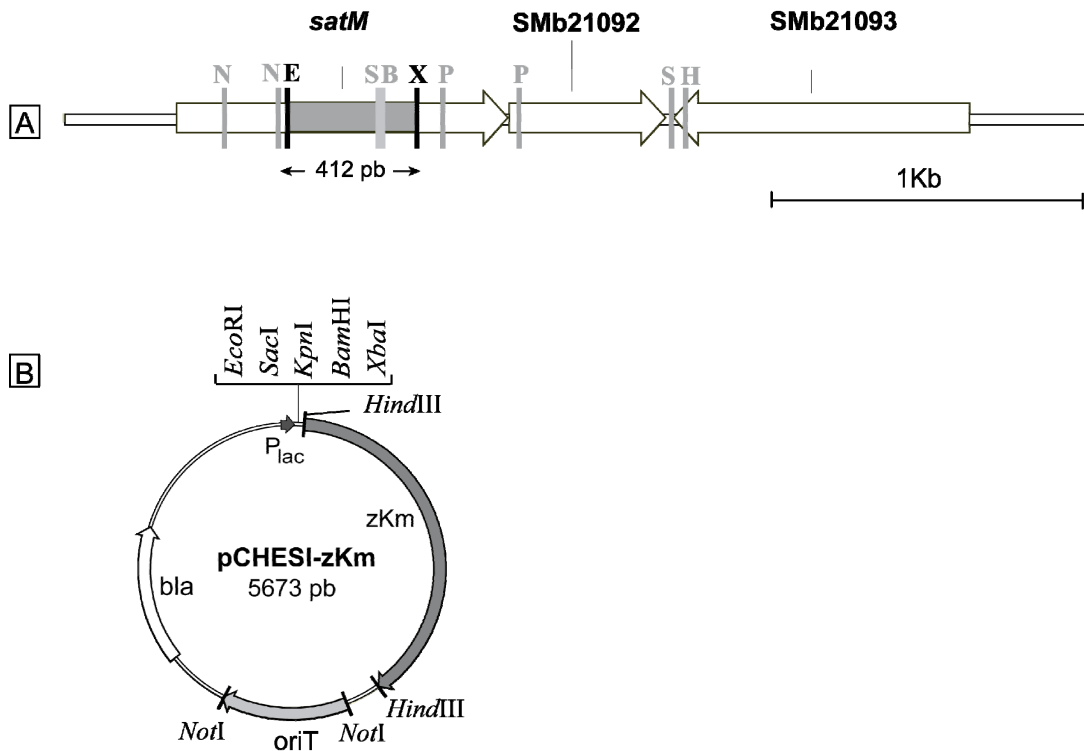


Figura 2.70. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCH091. **A;** Inserto de 412 pb amplificado y clonado en el sitio *EcoRI* del plásmido pCHESI-zKm (en orientación E-X) dando lugar a la construcción pCH091. **B;** Mapa físico del vector pCHESI-zKm. N; *NotI*, E; *EcoRI*, S; *SmaI*, X; *XbaI*, P; *PstI*, H; *HindIII*.

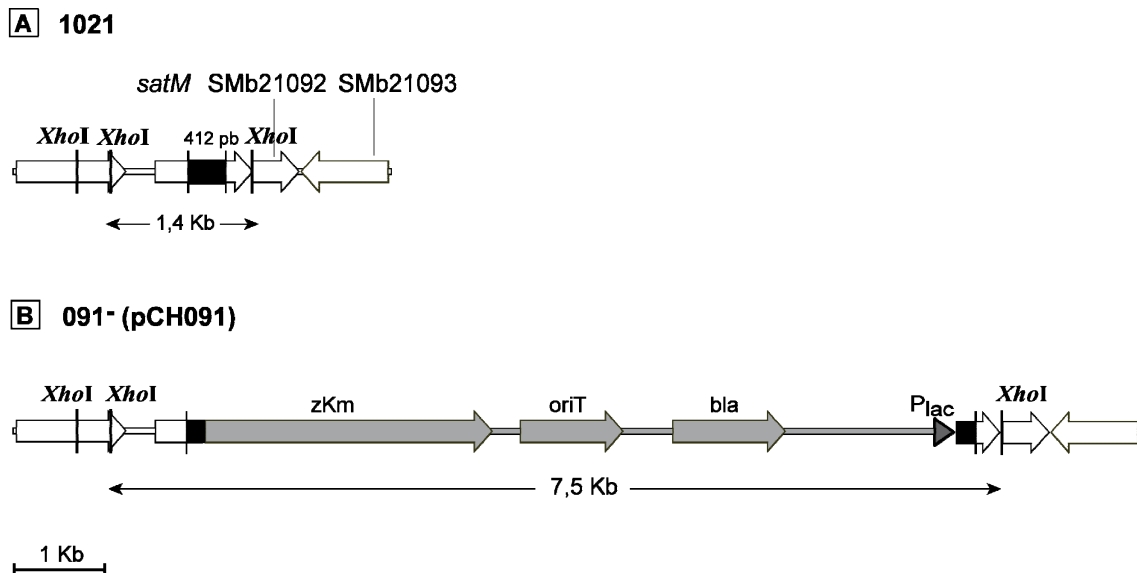


Figura 2.71. Representación esquemática de la obtención del mutante 091⁻ (pCH091) mediante simple integración del plásmido pCH091. **A;** fragmento de 412 pb (recuadro de color negro) que fue marcado con digoxigenina y utilizado como sonda para hibridar con un fragmento *XhoI* de 1,4 Kb en la cepa silvestre 1021. **B;** Representación de la mutación en el gen *lysM* por la

integración del plásmido pCH091 (región gris y negra). La sonda hibrida con un fragmento *Xho*I que por efecto de la mutación pasa a tener un tamaño de 7,5 Kb.

5.2. Obtención del mutante 091⁻ a partir del plásmido pSUP202pol4.

La construcción del mutante a partir del plásmido suicida pSup202pol4 de un tamaño de 6,7 Kb, se realizó de manera similar a la obtención del plásmido pCH091. Un fragmento de 412 pb (procedente del plásmido pG091 (SI)) fue clonado en el sitio *Eco*RI del vector pSup202pol4 dando lugar a la construcción pS091. Este plásmido tampoco puede replicarse en *Rhizobium* y la mutación en el gen SMb21091 también ocurrió por integración de todo el vector. Los transconjugantes fueron seleccionados por la resistencia a tetraciclina del pSUP202pol4 y se comprobaron por hibridación de igual forma que el mutante 091⁻ (pCH091). Pero a diferencia de éste último, en la cepa 091⁻ (pS091) el fragmento *Xho*I pasó de tener un tamaño de 1,4 Kb a tener uno de 8,5 Kb por efecto de la inserción del plásmido pS091 (Figura 2.72).

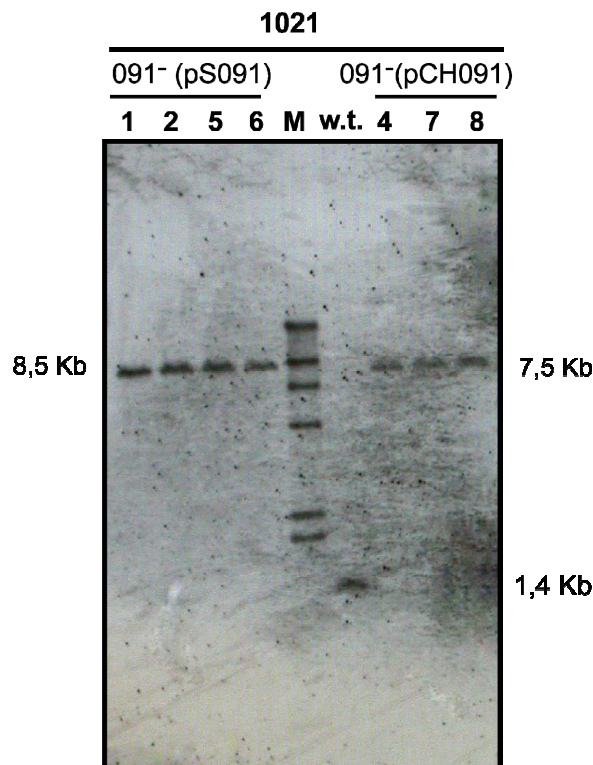


Figura 2.72. Comprobación de los mutantes en el gen *satM* de *S. meliloti* 1021. Hibridación del ADN genómico digerido con *Xho*I y utilizando como sonda el amplificado de la región correspondiente. M; Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1, 2, 5 y 6, mutantes 091⁻ (pS091); 4, 7 y 8, mutantes 091⁻ (pCH091); w.t., cepa silvestre 1021.

Anexo 6. Construcción del mutante en el gen SMb21092 (092') de *S. meliloti* 1021.

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir de ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 2356 pb que contenía el gen SMb21092 mediante el uso de los siguientes oligonucleótidos:

SMb21092-F 5'-ttat**ctaga**GAGACGACGAGTTCCGTTGT-3'
XbaI

SMb21092-R 5'-ttag**gattc**GCAGAACCTGACGGAGGAAT-3'
EcoRI

El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pG21092 (Figura 2.73A).

Por otro lado, se amplificó un fragmento de 1586 pb que contenía el cassette de resistencia a Sm/Spc del plásmido pHP45Ω mediante el uso de los oligonucleótidos siguientes:

Sm-Spc-F 5'-taact**cgag**CTGATCCGCATGCCCGTTTC-3'
XhoI

Sm-Spc-R 5'-ta**ggcgcgcc**AACTATTGCGATAAC-3'
AscI

Posteriormente, el plásmido pG21092 fue digerido *XhoI/AscI* y el inserto de 495 pb resultante fue sustituido por el cassette amplificado de Sm-Spc (Figura 2.73B). Así, se produjo una mutación en el gen SMb21092 que consistió en la delección del mismo y la inserción de un cassette de Sm/Spc de 1,6 Kb dando lugar al plásmido pG21092SS (Figura 2.73C). Por último, el fragmento *XbaI/EcoRI* de un tamaño de 3,4 Kb procedente de pG21092SS, fue clonado en el vector pSUP202pol4 para dar lugar al plásmido pS21092SS (Figura 2.73C). A continuación, esta construcción se movilizó hasta la cepa 1021 de *S. meliloti* para obtener finalmente el mutante SMb21092' (092'). Este vector tampoco puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium* y por tanto se pudieron seleccionar transconjugantes resistentes a Sm/Spc y sensibles a Tc, aquellos en los que se produjo el correspondiente intercambio alélico por doble recombinación homóloga.

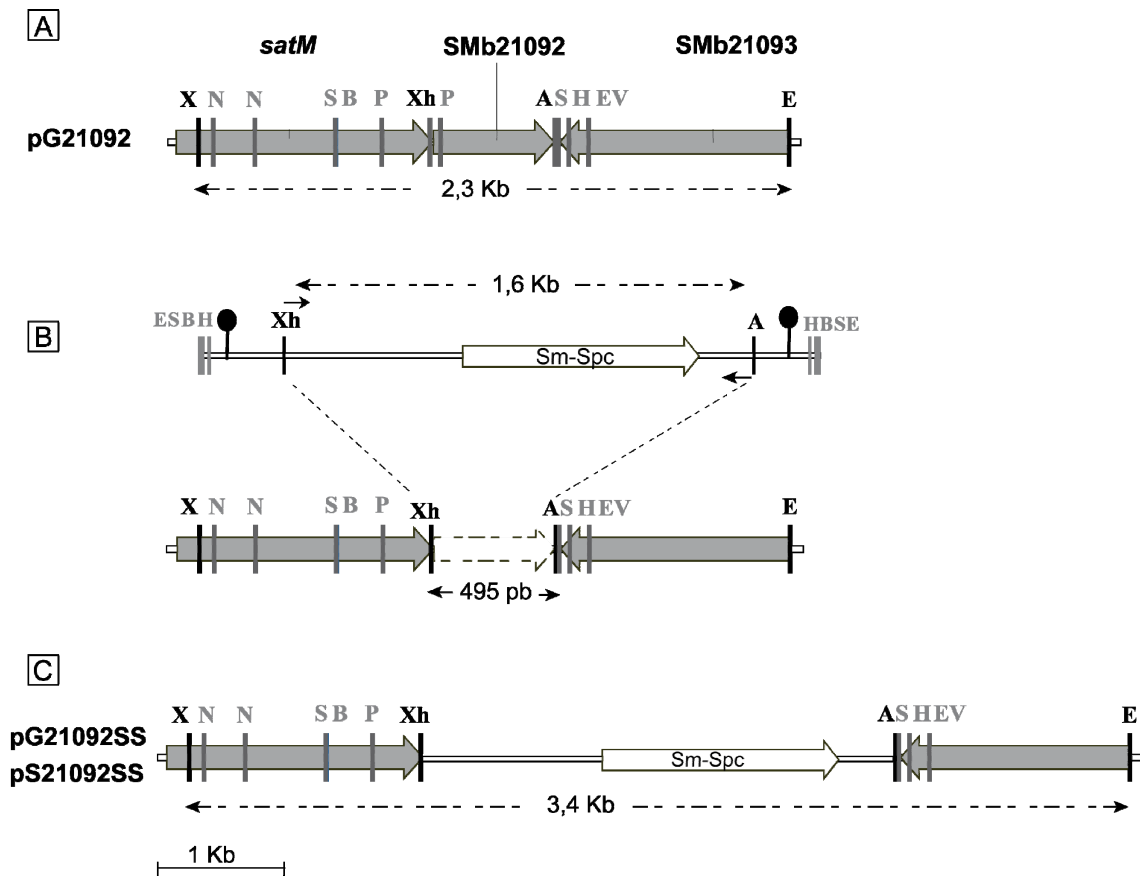
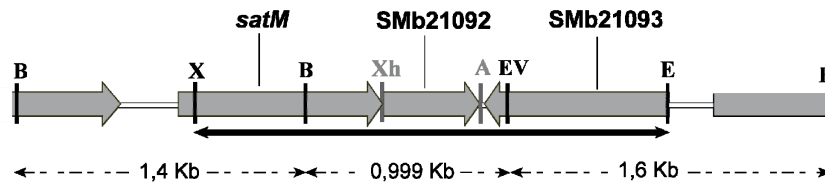


Figura 2.73. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pG21092 (A), pG21092SS y pS21092SS (C). Se muestra el fragmento amplificado de 2,3 Kb (A) así como el fragmento amplificado de 1,6 Kb del cassette de Sm/Spc (B). N; *NotI*, S; *SmaI*, B; *Bam*HI, P; *PstI*, Xh; *XhoI*, X; *XbaI*, A; *AscI*, H; *Hind*III, EV; *Eco*RV, E; *Eco*RI.

La mutación se verificó en cuatro transconjugantes mediante la hibridación de su ADN genómico digerido con *Bam*HI/*Eco*RV y utilizando como sonda el fragmento amplificado *XbaI/Eco*RI de 2,3 Kb marcado con digoxigenina (Figura 2.74A). La delección del gen SMb21092 e inserción del cassette de Sm/Spc dio lugar a que uno de los fragmentos *Bam*HI/*Eco*RV de 0,99 Kb presente en la cepa parental pasara a tener un tamaño de 2,09 Kb en los mutantes 092⁻ (Figura 2.75B y II.75A). Adicionalmente, se volvieron a comprobar los mutantes mediante hibridación de su ADN genómico, digerido esta vez con *Bam*HI, frente a la sonda descrita anteriormente (Figura 2.75B).

A 1021



B SMb21092⁻ (092⁻)

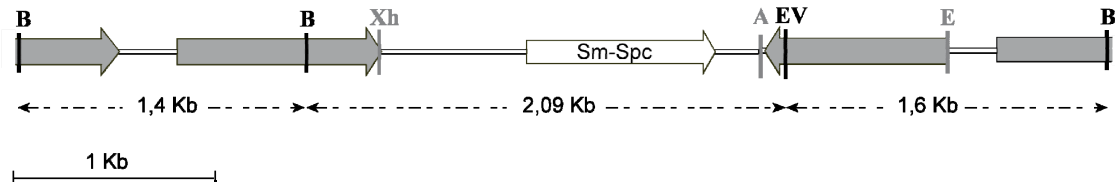


Figura 2.74. Representación esquemática de la construcción del mutante 092⁻ de *S. meliloti* 1021. **A**; inserto *XbaI/EcoRI* de 2,3 Kb (flecha negra) que fue marcado con digoxigenina y utilizado como sonda para hibridar con los fragmentos *BamHI/EcoRV* y *BamHI* de la cepa silvestre (1021). **B**; Representación del mutante 092⁻ obtenido por delección e inserción de cassette de *Sm/Spc*. B; *BamHI*, Xh; *XhoI*, X; *XbaI*, A; *AscI*, H; *HindIII*, EV; *EcoRV*, E; *EcoRI*.

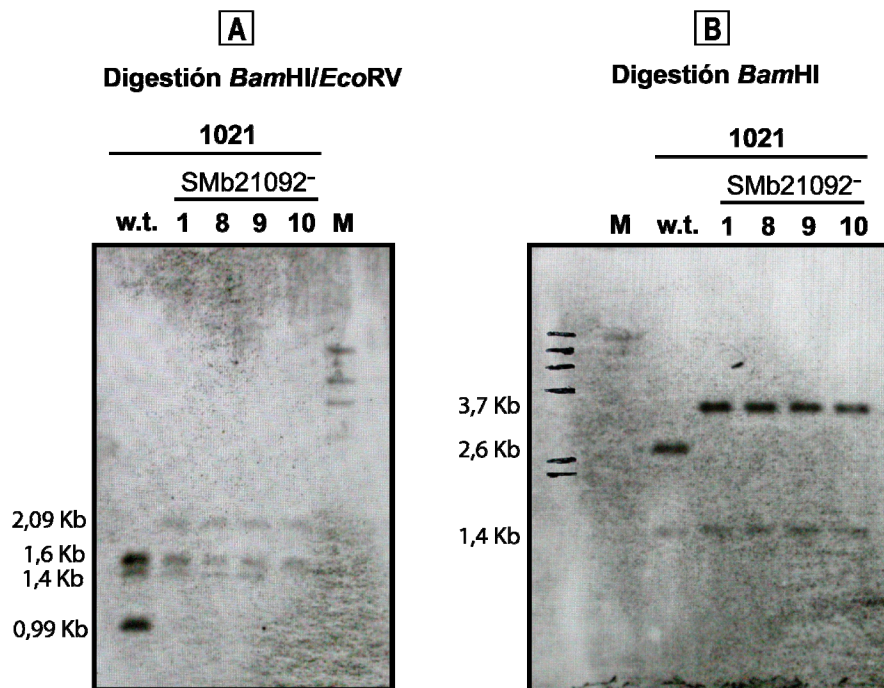


Figura 2.75. Comprobación de mutantes 092⁻ de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *BamHI/EcoRV* (**A**) y *BamHI* (**B**), usando como sonda el amplificado de la región. M; Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1, 8, 9 y 10, mutantes 092⁻; w.t., cepa silvestre.

Anexo 8. Contrucción de fusiones traduccionales de los genes SMb21091 (*satM*) y SMb21092 de *S. meliloti* 1021 al gen *phoA* de *E. coli*.

Para estas construcciones se utilizaron los vectores pUCH218 y pBBRphoA, de modo que el primero se empleó para determinar la actividad PhoA en una cepa de *E. coli* y el segundo para detectarla en *S. meliloti*. El plásmido pUCH218 que se utiliza principalmente para el análisis de proteínas de membrana, es un derivado de pUC18 que contiene un fragmento de 2,4 Kb que porta el gen que codifica la fosfatasa alcalina de *E. coli* desprovisto de su secuencia señal (*'phoA*). Delante de *'phoA* se encuentra parte del MCS original de pUC18, lo que facilita la construcción de fusiones traduccionales con *'phoA* (Figura 2.77B). En el caso del vector pBBRphoA, se trata de un derivado de pBBR1MCS-5 que contiene el fragmento *KpnI/HindIII* (de 2,3 Kb) procedente de pUCH218 (Figura 2.77B). Se emplea principalmente para analizar proteínas de membrana por actividad PhoA en bacterias del género *Pseudomonas* y *Rhizobium*, entre otras gram negativas.

8.1. Construcción de los plásmidos pUCHlysM y pBBRlysM.

Para la obtención de estas fusiones, se amplificó un fragmento de 179 pb, a partir del ADN genómico de *S. meliloti* 1021, que codifica para los 59 primeros aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína codificada por el gen SMb21091 (Figura 2.77A). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

LysMphoA1-F 5'-**ttaggtacc**GTTAGCAAGTCTCGTCAGTG-3'
KpnI

LysMphoA2-R 5'-**taagtcgac**GGACAACGGAAGTCTCGTCG-3'
SalI

El producto de PCR obtenido fue clonado en el vector pGEM[®]-T Easy para dar lugar al plásmido pGlysM(phoA). A continuación, esta construcción fue digerida *KpnI/SalI* y el fragmento de 179 pb resultante se clonó en los plásmidos pUCH218 y pBBRphoA (Figura 2.77B) obteniéndose finalmente las fusiones pUCHlysM y pBBRlysM. En el caso del vector pBBRphoA, *KpnI/SalI* son los dos únicos sitios para la fusión traduccional con PhoA. Todas las construcciones fueron comprobadas mediante extracción de ADN plásmídico y determinación del perfil de restricción de los plásmidos.

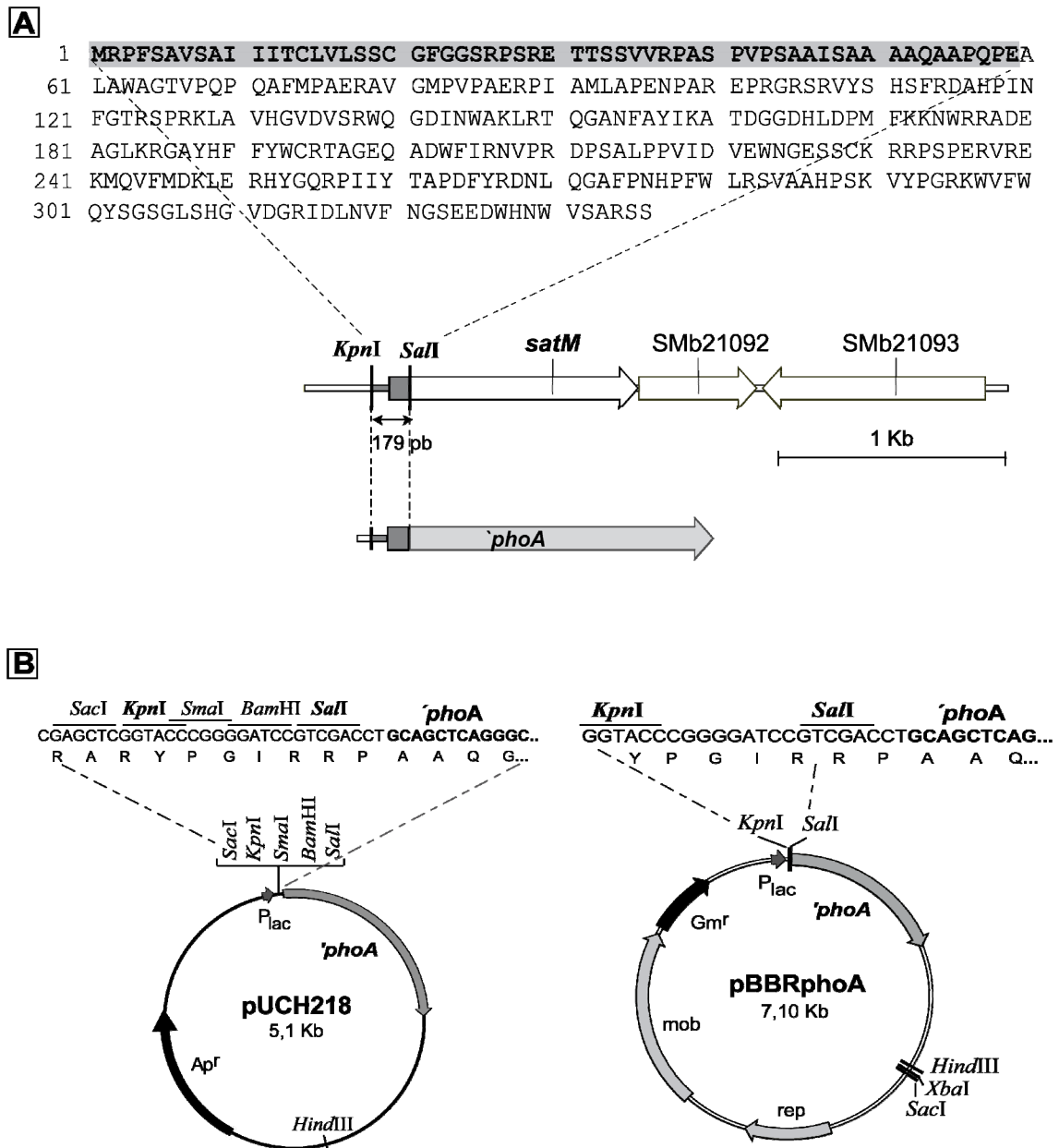


Figura 2.77. A; Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pUCHlysM y pBBRlysM que contienen sendas fusiones traduccionales a la fosfatasa alcalina ('PhoA) de *E. coli* desprovista de su secuencia señal. **B;** Mapa físico de los vectores pUCH218 y pBBRphoA.

8.2. Construcción de los plásmidos pUCH092 y pBBR092.

A partir del ADN genómico de *S. meliloti* 1021, se amplificó un fragmento de 537 pb que contenía al gen SMb21092. Los oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación fueron los siguientes:

21092phoA-F 5'- **tttgtacc**AACGTCTTCAACGGCAGCGA-3'
KpnI

21092phoA-R 5'- **ttgtcga**CCCGCCAGCCGCGCGAG-3'
SalI

A diferencia de las fusiones anteriores, se utilizó casi toda la secuencia del gen para la construcción de la fusión a la fosfatasa alcalina. En la figura 2.78 se muestra una representación esquemática del fragmento del gen SMb21092 utilizado para la construcción de las fusiones junto con la correspondiente secuencia aminoacídica. El fragmento amplificado fue clonado en el vector pGEM[®]-T Easy para dar lugar al plásmido pG092(phoA). A continuación, esta construcción fue digerida *KpnI/SalI* y el fragmento de 537 pb liberado se clonó en los plásmidos pUCH218 y pBBRphoA, obteniéndose finalmente las fusiones pUCH092 y pBBR092, respectivamente.

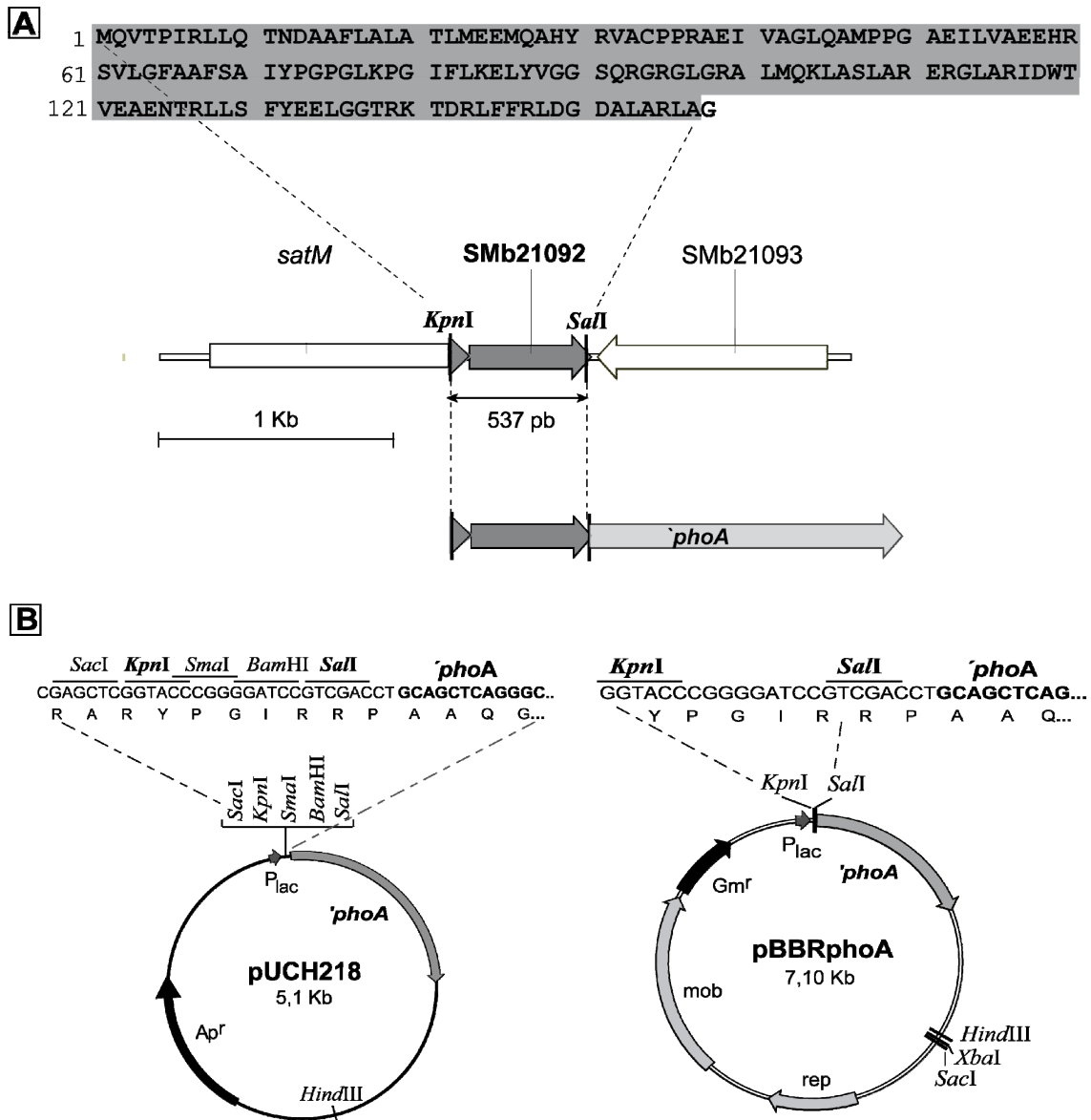


Figura 2.78. A; Representación esquemática del fragmento amplificado (537 pb) del gen SMb21092 para la construcción de los plásmidos pUCH092 y pBBR092. **B;** Se muestran los mapas de los vectores pUCH218 y pBBRphoA.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de genes de biosíntesis de trehalosa desde vectores plasmídicos no mejora el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* 1021 en medios salinos. La expresión de múltiples copias del gen *otsA* provoca un aumento de la trehalosa acumulada por esta bacteria, aumento que sin embargo no parece suficiente para mejorar su capacidad de osmoadaptación en las condiciones experimentales empleadas.
2. El gen SMb20968 de *Sinorhizobium meliloti* 1021 codifica para una probable glicosil hidrolasa y su sobreexpresión conlleva una disminución de los niveles de trehalosa intracelular en medios salinos, lo que sugiere su posible actividad como trehalosa hidrolasa. No obstante, la ausencia del gen SMb20968 no determina ningún cambio en los niveles de actividad trehalasa total, ni en la osmotolerancia de esta bacteria.
3. El plásmido simbiótico pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021 es necesario para la óptima capacidad osmoadaptativa de esta bacteria en medios salinos y para el crecimiento a pH ácido y a temperaturas no óptimas.
4. Los genes *rpoE5* e *ino1*, ambos localizados en el plásmido pSymB de *Sinorhizobium meliloti* 1021, no son por si solos necesarios para la osmotolerancia de la bacteria.
5. El gen *satM* es necesario para la tolerancia de *Sinorhizobium meliloti* 1021 a varios estreses abióticos: salinidad, pH ácido y temperaturas no óptimas de crecimiento.
6. El gen *satM* de *Sinorhizobium meliloti* 1021, que codifica para una proteína extracitoplasmática con probable actividad muramidasa, podría ser necesario para garantizar la óptima plasticidad de las envueltas celulares, particularmente el peptidoglucano y la membrana externa, en condiciones ambientales desfavorables.

BIBLIOGRAFÍA

- Ades, S. E.** 2004. Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 157-162.
- Ades, S. E., Connolly, L. E., Alba, B. M., y Gross, C. A.** 1999. The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev.* 13: 2449-2461.
- Aeschbacher, R. A., Müller, J., Boller, T., y Wiemken, A.** 1999. Purification of the trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. GMTRE1 is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiol* 119: 489-496.
- Alba, B. M., y Gross, C. A.** 2004. Regulation of the *Escherichia coli* sigmaE-dependent envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 52: 613-619.
- Alloing, G., Travers, I., Sagot, B., Le Rudulier, D., y Dupont, L.** 2006. Proline betaine uptake in *Sinorhizobium meliloti*: Characterization of Prb, an opp-like ABC transporter regulated by both proline betaine and salinity stress. *J. Bacteriol.* 188: 6308-6317.
- Amaral, F. C., Van Dijck, P., Nicoli, J. R., y Thevelein, J. M.** 1997. Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. *Arch. Microbiol.* 167: 202-208.
- Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., Long, S. R., Denarie, J., y Gough, C.** 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* 34: 495-506.
- Ampomah, O. Y., Jensen, J. B., y Bhuvaneshwari, T. V.** 2008. Lack of trehalose catabolism in *Sinorhizobium* species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes. *New Phytol.*
- Andersson, U., Levander, F., y Radstrom, P.** 2001. Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 276: 42707-42713.
- Argüelles, J. C.** 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 174: 217-224.
- Arisaka, F., Kanamaru, S., Leiman, P., y Rossmann, M. G.** 2003. The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 16-21.
- Arrighi, J. F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., Carvalho-Niebel, F., Journet, E. P., Gherardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Denarie, J., Rouge, P., y Gough, C.** 2006. The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* 142: 265-279.
- Ashraf, M., y Harris, P. J. C.** 2004. Potential biochemical indicators of salinity in plants. *Plant Sci.* 166: 3-16.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E., y Iturriaga, G.** 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC. Evol. Biol.* 6: 109.
- Baranova, N., y Nikaido, H.** 2002. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J. Bacteriol.* 184: 4168-4176.

- Bastiat, B., Sauviac, L., y Bruand, C.** 2010. Dual control of *Sinorhizobium meliloti* RpoE2 sigma factor activity by two PhyR-type two-component response regulators. *J. Bacteriol.* 192: 2255-2265.
- Becker, A., Bergès, H., Krol, E., Bruand, C., Rüberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F. J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Küster, H., Liebe, C., Pühler, A., Weidner, S., y Batut, J.** 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 292-303.
- Becker, A., Fraysse, N., y Sharypova, L.** 2005. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 899-905.
- Becker, A., y Pühler, A.** 1998. Specific amino acid substitutions in the proline-rich motif of the *Rhizobium meliloti* ExoP protein result in enhanced production of low-molecular-weight succinoglycan at the expense of high-molecular-weight succinoglycan. *J. Bacteriol.* 180: 395-399.
- Belocopitow, E., y Marechal, L. R.** 1970. Trehalose phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 198: 151-154.
- Beringer, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 188-198.
- Blackburn, N. T., y Clarke, A. J.** 2001. Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J. Mol. Evol.* 52: 78-84.
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., y Valla, S.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 370-379.
- Blázquez, M. A., Santos, E., Flores, C. L., Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J., y Gancedo, C.** 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13: 685-689.
- Bohin, J. P.** 2000. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 11-19.
- Boncompagni, E., Dupont, L., Mignot, T., Osteras, M., Lambert, A., Poggi, M. C., y Le Rudulier, D.** 2000. Characterization of a *Sinorhizobium meliloti* ATP-binding cassette histidine transporter also involved in betaine and proline uptake. *J. Bacteriol.* 182: 3717-3725.
- Boos, W., Ehmann, U., Bremer, E., Middendorf, A., y Postma, P.** 1987. Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *J. Biol. Chem.* 262: 13212-13218.
- Boos, W., Ehmann, U., Forkl, H., Klein, W., Rimmele, M., y Postma, P.** 1990. Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 3450-3461.
- Booth, I. R.** 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 359-378.
- Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M. C., y Le Rudulier, D.** 2002. BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184: 2654-2663.

- Boscari, A., Van de, S. G., Le Rudulier, D., y Mandon, K.** 2006. Overexpression of BetS, a *Sinorhizobium meliloti* high-affinity betaine transporter, in bacteroids from *Medicago sativa* nodules sustains nitrogen fixation during early salt stress adaptation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 896-903.
- Botsford, J. L.** 1984. Cyclic AMP phosphodiesterase in *Salmonella typhimurium*: characteristics and physiological function. *J. Bacteriol.* 160: 826-830.
- Botsford, J. L., y Lewis, T. A.** 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Production of Glutamic Acid in Response to Osmotic Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 488-494.
- Boyer, H. W., y Roulland-Dussoix, D.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braun, V., y Rehn, K.** 1969. Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* 10: 426-438.
- Brown, A. D.** 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40: 803-846.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S. E., Feldblyum, T. V., D'Ascenzo, M., Deng, W. L., Ramos, A. R., Alfano, J. R., Cartinhour, S., Chatterjee, A. K., Delaney, T. P., Lazarowitz, S. G., Martin, G. B., Schneider, D. J., Tang, X., Bender, C. L., White, O., Fraser, C. M., y Collmer, A.** 2003. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 10181-10186.
- Charles, T. C., y Finan, T. M.** 1991. Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated *in vivo*. *Genetics* 127: 5-20.
- Chen, I. V., y CHARALAMPOUS, F. C.** 1964. Biochemical studies on inositol. VII. Biosynthesis of inositol by a soluble enzyme system. *J. Biol. Chem.* 239: 1905-1910.
- Chen, I. V., y CHARALAMPOUS, F. C.** 1965. Biochemical studies on inositol. VIII. Purification and properties of the enzyme system which converts glucose 6-phosphate to inositol. *J. Biol. Chem.* 240: 3507-3512.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Glavina del Río, T., Dalin, E. et al.** 2006. Sequencing of the draft genome and assembly of *Sinorhizobium medicae* WSM419. Enviado en Agosto de 2006 a las bases de datos EMBL, GenBank y DDBJ.
- Costanzo, A., y Ades, S. E.** 2006. Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, by guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). *J. Bacteriol.* 188: 4627-4634.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., y Henrissat, B.** 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328: 307-317.
- Csonka, L. N., Gelvin, S. B., Goodner, B. W., Orser, C. S., Siemieniak, D., y Slightom, J. L.** 1988. Nucleotide sequence of a mutation in the *proB* gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene* 64: 199-205.

- Culbertson, M. R., y Henry, S. A.** 1975. Inositol-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 80: 23-40.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., y Bono, J. J.** 2001. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6: 24-30.
- Curatti, L., Porchia, A. C., Herrera-Estrella, L., y Salerno, G. L.** 2000. A prokaryotic sucrose synthase gene (*susA*) isolated from a filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium encodes a protein similar to those of plants. *Planta* 211: 729-735.
- d'Enfert, C., Bonini, B. M., Zapella, P. D., Fontaine, T., da Silva, A. M., y Terenzi, H. F.** 1999. Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 32: 471-483.
- d'Enfert, C., y Fontaine, T.** 1997. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiol.* 24: 203-216.
- D'Haese, W., y Holsters, M.** 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12: 79R-105R.
- da Costa, M. S., Santos, H., y Galinski, E. A.** 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 61: 117-153.
- Dardanelli, M. S., González, P. S., Bueno, M. A., y Ghittoni, N. E.** 2000. Synthesis, accumulation and hydrolysis of trehalose during growth of peanut rhizobia in hyperosmotic media. *J. Basic Microbiol.* 40: 149-156.
- De Las, P. A., Connolly, L., y Gross, C. A.** 1997. The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol. Microbiol.* 24: 373-385.
- De Smet, K. A., Weston, A., Brown, I. N., Young, D. B., y Robertson, B. D.** 2000. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* 146 (Pt 1): 199-208.
- Delory, M., Hallez, R., Letesson, J. J., y De, B., X** 2006. An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M. *J. Bacteriol.* 188: 7707-7710.
- Destruelle, M., Holzer, H., y Klionsky, D. J.** 1995. Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1*, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast* 11: 1015-1025.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D. R.** 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77: 7347-7351.
- Domínguez-Ferreras, A.** 2007. Identificación y caracterización de osmoadaptación en *Rhizobium* y de su papel en simbiosis con leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Domínguez-Ferreras, A., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M. J., y Sanjuán, J.** 2009a. Role of Potassium Uptake Systems in *Sinorhizobium meliloti* Osmoadaptation and Symbiotic Performance. *J. Bacteriol.*
- Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J., y Sanjuán, J.** 2006. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188: 7617-7625.

- Dominguez-Ferreras, A., Soto, M. J., Perez-Arnedo, R., Olivares, J., y Sanjuan, J.** 2009. Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* Osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots. *J. Bacteriol.* 191: 7490-7499.
- Domínguez-Ferreras, A., Soto, M. J., Pérez-Arnedo, R., Olivares, J., y Sanjuán, J.** 2009b. Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* Osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots. *J. Bacteriol.* 191: 7490-7499.
- Dupont, L., Garcia, I., Poggi, M. C., Alloing, G., Mandon, K., y Le Rudulier, D.** 2004. The *Sinorhizobium meliloti* ABC transporter Cho is highly specific for choline and expressed in bacteroids from *Medicago sativa* nodules. *J. Bacteriol.* 186: 5988-5996.
- Durell, S. R., Bakker, E. P., y Guy, H. R.** 2000. Does the KdpA subunit from the high affinity K(+)-translocating P-type KDP-ATPase have a structure similar to that of K(+) channels? *Biophys. J.* 78: 188-199.
- Dylan, T., Helinski, D. R., y Ditta, G. S.** 1990. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1----2)-glucan. *J. Bacteriol.* 172: 1400-1408.
- Eis, C., Albert, M., Dax, K., y Nidetzky, B.** 1998. The stereochemical course of the reaction mechanism of trehalose phosphorylase from *Schizopyllum commune*. *FEBS Lett.* 440: 440-443.
- Eis, C., y Nidetzky, B.** 1999. Characterization of trehalose phosphorylase from *Schizopyllum commune*. *Biochem. J.* 341 (Pt 2): 385-393.
- Elbein, A. D.** 1974. The metabolism of alpha, alpha-trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 227-256.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., y Carroll, D.** 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- Empadinhas, N., y da Costa, M. S.** 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.* 11: 151-161.
- Epstein, W.** 2003. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 75: 293-320.
- Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O., y Sanjuán, J.** 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1088-1098.
- Farias-Rodríguez, R., Mellor, R. B. A. C., y Peña-Cabriales, J. J.** 1998. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiol. Plantarum* 102: 353-359.
- Ferguson, G. P., Roop, R. M., y Walker, G. C.** 2002. Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* *BacA* mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. *J. Bacteriol.* 184: 5625-5632.
- Figurski, D. H., y Helinski, D. R.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 1648-1652.
- Finan, T. M., Oresnik, I., y Bottacin, A.** 1988. Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. *J. Bacteriol.* 170: 3396-3403.

- Flechard, M., Fontenelle, C., Blanco, C., Goude, R., Ermel, G., y Trautwetter, A. 2010. RpoE2 of *Sinorhizobium meliloti* is necessary for trehalose synthesis and growth in hyperosmotic media. *Microbiology*.
- Flechard, M., Fontenelle, C., Trautwetter, A., Ermel, G., y Blanco, C. 2009. *Sinorhizobium meliloti* rpoE2 is necessary for H₂O₂ stress resistance during the stationary growth phase. *FEMS Microbiol. Lett.* 290: 25-31.
- Foster, A. J., Jenkinson, J. M., y Talbot, N. J. 2003. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J.* 22: 225-235.
- Fougère, F., Le Rudulier, D., y Streeter, J. G. 1991. Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 96: 1228-1236.
- Francez-Charlot, A., Frunzke, J., Reichen, C., Ebnetter, J. Z., Gourion, B., y Vorholt, J. A. 2009. Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106: 3467-3472.
- Fraysse, N., Couderc, F., y Poinso, V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1365-1380.
- Fung, J., MacAlister, T. J., y Rothfield, L. I. 1978. Role of murein lipoprotein in morphogenesis of the bacterial division septum: phenotypic similarity of *IkyD* and *Ipo* mutants. *J. Bacteriol.* 133: 1467-1471.
- Gage, D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280-300.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C., y Batut, J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.
- Galinski, E. A., y Trüper, H. G. 1999. Microbial behaviour in salt stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 108.
- Galinski, E. A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol* 37: 272-328.
- Galinski, E. A., Pfeiffer, H. P., y Truper, H. G. 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidincarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem.* 149: 135-139.
- Gardella, T., Moyle, H., y Susskind, M. M. 1989. A mutant *Escherichia coli* sigma 70 subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Mol. Biol.* 206: 579-590.
- Giaever, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I., y Strom, A. R. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 2841-2849.
- Glazebrook, J., y Walker, G. C. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56: 661-672.

- Goddijn, O. J., Verwoerd, T. C., Voogd, E., Krutwagen, R. W., de Graaf, P. T., van Dun, K., Poels, J., Ponstein, A. S., Damm, B., y Pen, J.** 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113: 181-190.
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., y Dávila, G.** 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 3834-3839.
- Gorkovenko, A., y Roberts, M. F.** 1993. Cyclic 2,3-diphosphoglycerate as a component of a new branch in gluconeogenesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H. *J. Bacteriol.* 175: 4087-4095.
- Gotsche, S., y Dahl, M. K.** 1995. Purification and characterization of the phospho-alpha(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* 177: 2721-2726.
- Goude, R., Renaud, S., Bonnassie, S., Bernard, T., y Blanco, C.** 2004. Glutamine, glutamate, and alpha-glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6535-6541.
- Gouffi, K., Bernard, T., y Blanco, C.** 2000. Osmoprotection by pipercolic acid in *Sinorhizobium meliloti*: specific effects of D and L isomers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2358-2364.
- Gouffi, K., Pica, N., Pichereau, V., y Blanco, C.** 1999. Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1491-1500.
- Gouffi, K., Pichereau, V., Rolland, J. P., Thomas, D., Bernard, T., y Blanco, C.** 1998. Sucrose is a nonaccumulated osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180: 5044-5051.
- Gourion, B., Francez-Charlot, A., y Vorholt, J. A.** 2008. PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 190: 1027-1035.
- Gourion, B., Sulser, S., Frunzke, J., Francez-Charlot, A., Stiefel, P., Pessi, G., Vorholt, J. A., y Fischer, H. M.** 2009. The PhyR-sigma(EcfG) signalling cascade is involved in stress response and symbiotic efficiency in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* 73: 291-305.
- Green, H. A., y Donohue, T. J.** 2006. Activity of *Rhodobacter sphaeroides* RpoHII, a second member of the heat shock sigma factor family. *J. Bacteriol.* 188: 5712-5721.
- Griffitts, J. S., Carlyon, R. E., Erickson, J. H., Moulton, J. L., Barnett, M. J., Toman, C. J., y Long, S. R.** 2008. A *Sinorhizobium meliloti* osmosensory two-component system required for cyclic glucan export and symbiosis. *Mol. Microbiol.* 69: 479-490.
- Gross, C. A., Chan, C. L., y Lonetto, M. A.** 1996. A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 351: 475-482.
- Hars, U., Horlacher, R., Boos, W., Welte, W., y Diederichs, K.** 1998. Crystal structure of the effector-binding domain of the trehalose-repressor of *Escherichia coli*, a member of the LacI family, in its complexes with inducer trehalose-6-phosphate and noninducer trehalose. *Protein Sci.* 7: 2511-2521.
- Hash, J. H.** 1967. Measurement of Bacteriolytic Enzymes. *J. Bacteriol.* 93: 1201-1202.
- Hattermann, D. R., y Stacey, G.** 1990. Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 833-836.

- Hayden, J. D., y Ades, S. E.** 2008. The Extracytoplasmic Stress Factor, sigma^E, Is Required to Maintain Cell Envelope Integrity in *Escherichia coli*. *PLoS. ONE*. 3: e1573.
- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H., y Höltje, J. V.** 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 6093-6099.
- Hellweg, C., Pühler, A., y Weidner, S.** 2009. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC. Microbiol.* 9: 37.
- Helmann, J. D.** 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol* 46: 47-110.
- Hengge-Aronis, R.** 1996. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21: 887-893.
- Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 373-95, table.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M., y Boos, W.** 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 7918-7924.
- Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T., y Yamaguchi, A.** 2003. Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 576-582.
- Hoelzler, I., y Streeter, J. G.** 1990. Stimulation of α -glucosidases from fast-growing rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens* by K⁺, NH₄⁺ y Rb⁺. *Can. J. Microbiol.* 36: 223-227.
- Höltje, J. V.** 1995. From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 164: 243-254.
- Holtmann, G., Bakker, E. P., Uozumi, N., y Bremer, E.** 2003. KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* 185: 1289-1298.
- Horlacher, R., y Boos, W.** 1997. Characterization of TreR, the major regulator of the *Escherichia coli* trehalose system. *J. Biol. Chem.* 272: 13026-13032.
- Horlacher, R., Uhland, K., Klein, W., Ehrmann, M., y Boos, W.** 1996. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 6250-6257.
- Inukai, M., Takeuchi, M., Shimizu, K., y Arai, M.** 1978. Mechanism of action of globomycin. *J. Antibiot.* 31: 1203-1205.
- Jebbar, M., Sohn-Bosser, L., Bremer, E., Bernard, T., y Blanco, C.** 2005. Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an Ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J. Bacteriol.* 187: 1293-1304.
- Jensen, J. B., Ampomah, O. Y., Darrah, R., Peters, N. K., y Bhuvanewari, T. V.** 2005. Role of trehalose transport and utilization in *Sinorhizobium meliloti*--alfalfa interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 694-702.
- Jensen, J. B., Peters, N. K., y Bhuvanewari, T. V.** 2002. Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184: 2978-2986.

- Jiang, J. Q., Wei, W., Du, B. H., Li, X. H., Wang, L., y Yang, S. S.** 2004. Salt-tolerance genes involved in cation efflux and osmoregulation of *Sinorhizobium fredii* RT19 detected by isolation and characterization of Tn5 mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* 239: 139-146.
- Jollès, P., y Jollès, J.** 1984. What's new in lysozyme research? *Molec. Cell. Biochem.* 63: 165-189.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., y Walker, G. C.** 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 619-633.
- Jorge, C. D., Lamosa, P., y Santos, H.** 2007. Alpha-D-mannopyranosyl-(1-->2)-alpha-D-glucopyranosyl-(1-->2)-glycerate in the thermophilic bacterium *Petrotoga mitherma*--structure, cellular content and function. *FEBS J.* 274: 3120-3127.
- Kamisango, K., Dell, A., y Ballou, C. E.** 1987. Biosynthesis of the mycobacterial O-methylglucose lipopolysaccharide. Characterization of putative intermediates in the initiation, elongation, and termination reactions. *J. Biol. Chem.* 262: 4580-4586.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., y Tabata, S.** 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.
- 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., y Tabata, S.** 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9: 189-197.
- Kannenberg, E. L., y Brewin, N. J.** 1989. Expression of a cell surface antigen from *Rhizobium leguminosarum* 3841 is regulated by oxygen and pH. *J. Bacteriol.* 171: 4543-4548.
- Kannenberg, E. L., y Brewin, N. J.** 1994. Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends Microbiol.* 2: 277-283.
- Keen, N. T., y Williams, P. H.** 1969. Translocation of Sugars Into Infected Cabbage Tissues During Clubroot Development. *Plant Physiol* 44: 748-754.
- Kets, E. P., Galinski, E. A., de Wit, M., de Bont, J. A., y Heipieper, H. J.** 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* 178: 6665-6670.
- Kitamoto, Y., Akashi, H., Tanaka, H., y Mori, N.** 1988. Alpha-glucose-1-phosphate formation by a novel trehalose phosphorylase from *Flammulina velutipes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 55: 147-150.
- Klein, W., Horlacher, R., y Boos, W.** 1995. Molecular analysis of *treB* encoding the *Escherichia coli* enzyme II specific for trehalose. *J. Bacteriol.* 177: 4043-4052.
- Kobayashi, H., Simmons, L. A., Yuan, D. S., Broughton, W. J., y Walker, G. C.** 2007. Multiple Ku orthologues mediate DNA non-homologous end-joining in the free-living form and during chronic infection of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.*
- Kopp, M., Muller, H., y Holzer, H.** 1993. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268: 4766-4774.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., y Peterson, K. M.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.

- Krol, E., y Becker, A.** 2004. Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol. Genet. Genomics* 272: 1-17.
- Kyte, J., y Doolittle, R. F.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M. Y., Silva, G., Rodrigues-Pousada, C., LeGall, J., Maycock, C., y Santos, H.** 2000. Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1974-1979.
- Lamosa, P., Goncalves, L. G., Rodrigues, M. V., Martins, L. O., Raven, N. D., y Santos, H.** 2006. Occurrence of 1-glycerol-1-*myo*-inositol phosphate in hyperthermophiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6169-6173.
- Lederberg, E. M., y Cohen, S. N.** 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119: 1072-1074.
- Leigh, J. A., y Walker, G. C.** 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* 10: 63-67.
- Llamas, M. A., Ramos, J. L., y Rodriguez-Herva, J. J.** 2003. Transcriptional organization of the *Pseudomonas putida tol-oprL* genes. *J. Bacteriol.* 185: 184-195.
- Lloret, J., Bolaños, L., Lucas, M. M., Peart, J. M., Brewin, N. J., Bonilla, I., y Rivilla, R.** 1995. Ionic Stress and Osmotic Pressure Induce Different Alterations in the Lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3701-3704.
- Lloret, J., Wulff, B. B., Rubio, J. M., Downie, J. A., Bonilla, I., y Rivilla, R.** 1998. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1024-1028.
- Lommatzsch, J., Templin, M. F., Kraft, A. R., Vollmer, W., y Holtje, J. V.** 1997. Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 5465-5470.
- Long, S., McCune, S., y Walker, G. C.** 1988. Symbiotic loci of *Rhizobium meliloti* identified by random TnphoA mutagenesis. *J. Bacteriol.* 170: 4257-4265.
- Loos, H., Kramer, R., Sahm, H., y Sprenger, G. A.** 1994. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *J. Bacteriol.* 176: 7688-7693.
- López, M., Herrera-Cervera, J. A., Tejera, N. A., y Lluch, C.** 2006. Trehalose metabolism in root nodules of the model legume *Lotus japonicus* in response to salt stress. *Physiol Plant* 128: 701-709.
- López, M., Tejera, N. A., Iribarne, C., Lluch, C., y Herrera-Cervera, J. A.** 2008. Trehalose and trehalase in root nodules of *Medicago truncatula* and *Phaseolus vulgaris* in response to salt stress. *Physiol Plant* 134: 575-582.
- López, M. F., y Torrey, J. G.** 1985. Enzymes of glucose metabolism in *Frankia* sp. *J. Bacteriol.* 162: 110-116.
- Lunn, J. E.** 2002. Evolution of sucrose synthesis. *Plant. Physiol.* 128: 1490-1500.

- Lunn, J. E., y MacRae, E. 2003. New complexities in the synthesis of sucrose. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 208-214.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., and Parker, J. 2003. Brock. Biología de los Microorganismos.
- Majumder, A. L., Chatterjee, A., Ghosh, D. K., y Majee, M. 2003. Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase. *FEBS Lett.* 553: 3-10.
- Makihara, F., Tsuzuki, M., Sato, K., Masuda, S., Nagashima, K. V., Abo, M., y Okubo, A. 2005. Role of trehalose synthesis pathways in salt tolerance mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *Arch. Microbiol.*: 1-10.
- Mandon, K., Osteras, M., Boncompagni, E., Trinchant, J. C., Spennato, G., Poggi, M. C., y Le Rudulier, D. 2003. The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (*betI/CBA*) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 709-719.
- Manoil, C., y Beckwith, J. 1985. TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82: 8129-8133.
- Martin, D. D., Ciulla, R. A., y Roberts, M. F. 1999. Osmoadaptation in archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1815-1825.
- Martínez-Salazar, J. M., Sandoval-Calderón, M., Guo, X., Castillo-Ramírez, S., Reyes, A., Loza, M. G., Rivera, J., Alvarado-Affantranger, X., Sánchez, F., González, V., Dávila, G., y Ramírez-Romero, M. A. 2009. The *Rhizobium etli* RpoH1 and RpoH2 sigma factors are involved in different stress responses. *Microbiology* 155: 386-397.
- Martins, L. O., Carreto, L. S., da Costa, M. S., y Santos, H. 1996. New compatible solutes related to Di-myo-inositol-phosphate in members of the order *Thermotogales*. *J. Bacteriol.* 178: 5644-5651.
- Martins, L. O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K. O., Da Costa, M. S., y Santos, H. 1997. Organic Solutes in Hyperthermophilic Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 896-902.
- Martins, L. O., y Santos, H. 1995. Accumulation of Mannosylglycerate and Di-myo-Inositol-Phosphate by *Pyrococcus furiosus* in Response to Salinity and Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3299-3303.
- Mascher, T., Hachmann, A. B., y Helmann, J. D. 2007. Regulatory overlap and functional redundancy among *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factors. *J. Bacteriol.* 189: 6919-6927.
- Matthijs, S., Koedam, N., Cornelis, P., y De Greve, H. 2000. The trehalose operon of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400. *Res. Microbiol.* 151: 845-851.
- McIntyre, H. J., Davies, H., Hore, T. A., Miller, S. H., Dufour, J. P., y Ronson, C. W. 2007. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3984-3992.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E. T., y Epstein, W. 1994. Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 1911-1917.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E., y Ausubel, F. M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149: 114-122.

- Mercado-Blanco, J., García, F., Fernández-López, M., y Olivares, J.** 1993. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. *J. Bacteriol.* 175: 5403-5410.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., y Kondorosi, E.** 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 5230-5235.
- Mikkat, S., Galinski, E. A., Berg, G., Minkwitz, A., y Schoor, A.** 2000. Salt adaptation in pseudomonads: characterization of glucosylglycerol-synthesizing isolates from brackish coastal waters and the rhizosphere. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 31-40.
- Mikkat, S., Hagemann, M., y Schoor, A.** 1996. Active transport of glucosylglycerol is involved in salt adaptation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* 142 (Pt 7): 1725-1732.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS. Nueva York, N.Y.
- Miller, K. J., y Wood, J. M.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 101-136.
- Miller-Williams, M., Loewen, P. C., y Oresnik, I. J.** 2006. Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiology* 152: 2049-2059.
- Mitsui, H., Sato, T., Sato, Y., Ito, N., y Minamisawa, K.** 2004. *Sinorhizobium meliloti* RpoH₁ is required for effective nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa. *Mol. Genet. Genomics* 271: 416-425.
- Movahedzadeh, F., Smith, D. A., Norman, R. A., Dinadayala, P., Murray-Rust, J., Russell, D. G., Kendall, S. L., Rison, S. C., McAlister, M. S., Bancroft, G. J., McDonald, N. Q., Daffe, M., Av-Gay, Y., y Stoker, N. G.** 2004. The *Mycobacterium tuberculosis* *ino1* gene is essential for growth and virulence. *Mol. Microbiol.* 51: 1003-1014.
- Müller, J., Aeschbacher, R. A., Wingler, A., Boller, T., y Wiemken, A.** 2001. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 125: 1086-1093.
- Müller, J., Boller, T., y Wiemken, A.** 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* 112: 1-9.
- Müller, J., Staehelin, C., Mellor, R. B., Boller, T., y Wiemken, A.** 1992. Partial purification and characterization of trehalase from soybean nodules. *J. Plant Physiol.* 140: 8-13.
- Müller, J., Xie, Z.-P., Staehelin, C., Boller, T., y Wiemken, A.** 1994. Effects of nitrate on accumulation of trehalose and other carbohydrates and on trehalase activity in soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* 143: 153-160.
- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., y Yamaguchi, A.** 2002. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* 184: 4161-4167.
- Narberhaus, F., Krummenacher, P., Fischer, H. M., y Hennecke, H.** 1997. Three disparately regulated genes for sigma 32-like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* 24: 93-104.
- Nguyen, C. C., y Saier, M. H., Jr.** 1995. Phylogenetic, structural and functional analyses of the LacI-GalR family of bacterial transcription factors. *FEBS Lett.* 377: 98-102.

- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C., y Sanjuán, J.** 2002. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 225-232.
- Nunes, O. C., Manaia, C. M., da Costa, M. S., y Santos, H.** 1995. Compatible Solutes in the Thermophilic Bacteria *Rhodothermus marinus* and "*Thermus thermophilus*". *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2351-2357.
- Nwaka, S., y Holzer, H.** 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58: 197-237.
- Nwaka, S., Kopp, M., y Holzer, H.** 1995. Expression and function of the trehalase genes NTH1 and YBR0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270: 10193-10198.
- Oke, V., Rushing, B. G., Fisher, E. J., Moghadam-Tabrizi, M., y Long, S. R.** 2001. Identification of the heat-shock sigma factor RpoH and a second RpoH-like protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 147: 2399-2408.
- Oldroyd, G. E., y Downie, J. A.** 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 566-576.
- Olivares, J., Casadesus, J., y Bedmar, E. J.** 1980. Method for Testing Degree of Infectivity of *Rhizobium meliloti* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 967-970.
- Ono, Y., Mitsui, H., Sato, T., y Minamisawa, K.** 2001. Two RpoH homologs responsible for the expression of heat shock protein genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 264: 902-912.
- Oren, A.** 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline. Systems.* 4: 2.
- Oresnik, I. J., Liu, S. L., Yost, C. K., y Hynes, M. F.** 2000. Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.* 182: 3582-3586.
- Osteras, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M. C., y Le Rudulier, D.** 1998. Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti bet* operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 11394-11399.
- Parrou, J. L., Jules, M., Beltran, G., y Francois, J.** 2005. Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: Localization, regulation and physiological function. *FEMS Yeast Res.* 5: 503-511.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., y Zhang, Y.** 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-441.
- Pedreño, Y., Maicas, S., Argüelles, J. C., Sentandreu, R., y Valentin, E.** 2004. The ATC1 gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 279: 40852-40860.
- Perret, X., Staehelin, C., y Broughton, W. J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180-201.
- Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- Pflüger, K., Baumann, S., Gottschalk, G., Lin, W., Santos, H., y Müller, V.** 2003. Lysine-2,3-aminomutase and beta-lysine acetyltransferase genes of methanogenic archaea are salt

induced and are essential for the biosynthesis of Nepsilon-acetyl-beta-lysine and growth at high salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6047-6055.

Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., Nattkemper, T. W., y Becker, A. 2006. Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4329-4337.

Pocard, J. A., Bernard, T., Smith, L. T., y Le Rudulier, D. 1989. Characterization of three choline transport activities in *Rhizobium meliloti*: modulation by choline and osmotic stress. *J. Bacteriol.* 171: 531-537.

Poolman, B., y Glaasker, E. 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* 29: 397-407.

Prentki, P., y Krisch, H. M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 303-313.

Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50-108.

Qu, Q., Lee, S. J., y Boos, W. 2004. TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* 279: 47890-47897.

Quintela, J. C., de Pedro, M. A., Zollner, P., Allmaier, G., y Garcia del Portillo, F. 1997. Peptidoglycan structure of *Salmonella typhimurium* growing within cultured mammalian cells. *Mol. Microbiol.* 23: 693-704.

Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., y Stougaard, J. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.

Raffa, R. G., y Raivio, T. L. 2002. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45: 1599-1611.

Raivio, T. L. 2005. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 56: 1119-1128.

Raivio, T. L., y Silhavy, T. J. 1999. The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 159-165.

Reguera, M., Lloret, J., Margaret, I., Vinardell, J. M., Martín, M., Buendía, A., Rivilla, R., Ruiz-Sainz, J. E., Bonilla, I., y Bolaños, L. 2009. Gene SMb21071 of plasmid pSymB is required for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti* 1021 and is implicated in modifications of cell surface polysaccharides structure in response to hyperosmotic stress. *Can. J. Microbiol.* 55: 1145-1152.

Reuhs, B. L., Kim, J. S., Badgett, A., y Carlson, R. W. 1994. Production of cell-associated polysaccharides of *Rhizobium fredii* USDA205 is modulated by apigenin and host root extract. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7: 240-247.

Rimmele, M., y Boos, W. 1994. Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 5654-5664.

Roberts, M. F. 2000. Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci.* 5: D796-D812.

- Roberts, M. F.** 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline. Systems.* 1: 5.
- Robertsen, B. K., Aman, P., Darvill, A. G., McNeil, M., and Albersheim, P.** 1981. Host-Symbiont Interactions : V. THE STRUCTURE OF ACIDIC EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES SECRETED BY RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM AND RHIZOBIUM TRIFOLIUM. *Plant Physiol* 67(3), 389-400.
- Rodionov, D. A., Kurnasov, O. V., Stec, B., Wang, Y., Roberts, M. F., y Osterman, A. L.** 2007. Genomic identification and in vitro reconstitution of a complete biosynthetic pathway for the osmolyte di-*myo*-inositol-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104: 4279-4284.
- Rodrigues, M. V., Borges, N., Henriques, M., Lamosa, P., Ventura, R., Fernandes, C., Empadinhas, N., Maycock, C., da Costa, M. S., y Santos, H.** 2007. Bifunctional CTP:inositol-1-phosphate cytidylyltransferase/CDP-inositol:inositol-1-phosphate transferase, the key enzyme for di-*myo*-inositol-phosphate synthesis in several (hyper)thermophiles. *J. Bacteriol.* 189: 5405-5412.
- Rodríguez, R. L., and Tait, R. C.** 1983. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.
- Rodríguez-Salazar, J., Suárez, R., Caballero-Mellado, J., y Iturriaga, G.** 2009. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 296: 52-59.
- Roesser, M., y Muller, V.** 2001. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ. Microbiol.* 3: 743-754.
- Ruberg, S., Tian, Z. X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Puhler, A., Weidner, S., y Becker, A.** 2003. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.* 106: 255-268.
- Salminen, S. O., y Streeter, J. G.** 1986. Enzymes of alpha,alpha-Trehalose Metabolism in Soybean Nodules. *Plant Physiol* 81: 538-541.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, N.Y.
- Santos, H., y da Costa, M. S.** 2002. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.* 4: 501-509.
- Santos, H., Lamosa, P., Borges, N., Faria, T. Q., and Neves, C.** 2007. The physiological role, biosynthesis and mode of action of compatible solutes from (hyper)thermophiles. In: Gerday C, Glandorff N (eds.) *Physiology and biochemistry of extremophiles*, ASM Press, Washington, DC, pp 86-103.
- Saum, S. H., y Müller, V.** 2008. Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environ. Microbiol.* 10: 716-726.
- Sauviac, L., Philippe, H., Phok, K., y Bruand, C.** 2007. An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 189: 4204-4216.
- Scheurwater, E., Reid, C. W., y Clarke, A. J.** 2007. Lytic transglycosylases: Bacterial space-making autolysins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*

- Schick, I., Haltrich, D., y Kulbe, K. D.** 1995. Trehalose phosphorylase from *Pichia fermentans* and its role in the metabolism of trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1095.
- Scholz, S., Sonnenbichler, J., Schafer, W., y Hensel, R.** 1992. Di-*myo*-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett.* **306**: 239-242.
- Schubert, A., Wyss, P., y Wiemken, A.** 1992. Occurrence of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and in mycorrhizal roots. *J. Plant Physiol.* **140**: 41-45.
- Shima, S., Herault, D. A., Berkessel, A., y Thauer, R. K.** 1998. Activation and thermostabilization effects of cyclic 2, 3-diphosphoglycerate on enzymes from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Arch. Microbiol.* **170**: 469-472.
- Silva, Z., Alarico, S., Nobre, A., Horlacher, R., Marugg, J., Boos, W., Mingote, A. I., y da Costa, M. S.** 2003. Osmotic adaptation of *Thermus thermophilus* RQ-1: lesson from a mutant deficient in synthesis of trehalose. *J. Bacteriol.* **185**: 5943-5952.
- Silva, Z., Borges, N., Martins, L. O., Wait, R., da Costa, M. S., y Santos, H.** 1999. Combined effect of the growth temperature and salinity of the medium on the accumulation of compatible solutes by *Rhodothermus marinus* and *Rhodothermus obamensis*. *Extremophiles.* **3**: 163-172.
- Simola, M., Hanninen, A. L., Stranius, S. M., y Makarow, M.** 2000. Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. *Mol. Microbiol.* **37**: 42-53.
- 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.
- Singer, M. A., y Lindquist, S.** 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell* **1**: 639-648.
- Sleator, R. D., y Hill, C.** 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.
- Smith, L. T., y Smith, G. M.** 1989. An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **171**: 4714-4717.
- Soto, M. J., Lepek, V., López-Lara, M. I., Olivares, J., y Toro, N.** 1992. Characterization of a *Rhizobium meliloti ndvB* Mutant and a Symbiotic Revertant that Regains Wild-Type Properties. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**: 288-293.
- Soto, T., Fernandez, J., Dominguez, A., Vicente-Soler, J., Cansado, J., y Gacto, M.** 1998. Analysis of the *ntp1+* gene, encoding neutral trehalase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* **1443**: 225-229.
- Soussi, M., Santamaría, M., Ocaña, A., y Lluch, C.** 2001. Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in a salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 476-481.
- Staron, A., Sofia, H. J., Dietrich, S., Ulrich, L. E., Liesegang, H., y Mascher, T.** 2009. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol. Microbiol.* **74**: 557-581.
- Stein, A. J., y Geiger, J. H.** 2002. The crystal structure and mechanism of 1-L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **277**: 9484-9491.

- Stokes, N. R.** 2003. A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: regulation of channel expression by RpoS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 15959-15964.
- Streeter, J. G.** 1985. Accumulation of alpha,alpha-trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *J. Bacteriol.* 164: 78-84.
- Streeter, J. G., y Gómez, M. L.** 2006. Three enzymes for trehalose synthesis in *Bradyrhizobium* cultured bacteria and in bacteroids from soybean nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4250-4255.
- Streit, W. R., Schmitz, R. A., Perret, X., Staehelin, C., Deakin, W. J., Raasch, C., Liesegang, H., y Broughton, W. J.** 2004. An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 186: 535-542.
- Strom, M. S., y Lory, S.** 1987. Mapping of export signals of *Pseudomonas aeruginosa* pilin with alkaline phosphatase fusions. *J. Bacteriol.* 169: 3181-3188.
- Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M. C., Cevallos, M. A., Lara, M., Hernández, G., y Iturriaga, G.** 2008. Improvement of Drought Tolerance and Grain Yield in Common Bean by Overexpressing Trehalose-6-Phosphate Synthase in Rhizobia. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 958-966.
- Talibart, R., Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Wroblewski, H., Blanco, C., y Bernard, T.** 1994. Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J. Bacteriol.* 176: 5210-5217.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., y Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tao, H., Brewin, N. J., y Noel, K. D.** 1992. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. *J. Bacteriol.* 174: 2222-2229.
- Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., Boonkerd, N., Singleton, P. W., y Borthakur, D.** 2006. The alternative sigma factor RpoH2 is required for salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3. *Res. Microbiol.* 157: 811-818.
- Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: IBP Handbook No 15.
- Vinocur, B., y Altman, A.** 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 123-132.
- Vogel, G., Aeschbacher, R. A., Müller, J., Boller, T., y Wiemken, A.** 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.* 13: 673-683.
- Wannet, W. J., Op den Camp, H. J., Wisselink, H. W., van der, D. C., Van Griensven, L. J., y Vogels, G. D.** 1998a. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1425: 177-188.
- Wannet, W. J., Op den Camp, H. J., Wisselink, H. W., van der, D. C., Van Griensven, L. J., y Vogels, G. D.** 1998b. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1425: 177-188.
- Wei, W., Jiang, J., Li, X., Wang, L., y Yang, S. S.** 2004. Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 278-283.

- Weickert, M. J., y Adhya, S.** 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol. Chem.* 267: 15869-15874.
- Welsh, D. T.** 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 263-290.
- Willis, L. B., y Walker, G. C.** 1999. A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an alpha-glucosidase and a periplasmic-binding-protein-dependent transport system for alpha-glucosides. *J. Bacteriol.* 181: 4176-4184.
- Wohlfarth, A., Severin, J., y Galinski, E. A.** 1993. Identification of *N*^ε-acetylornithine as a novel osmolyte in some Gram-positive halophilic eubacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 568-573.
- Wolf, A., Kramer, R., y Morbach, S.** 2003. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* 49: 1119-1134.
- Wood, J. M., Bremer, E., Csonka, L. N., Kraemer, R., Poolman, B., van der, H. T., y Smith, L. T.** 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 130: 437-460.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., y Messing, J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Young, J. P., Crossman, L. C., Johnston, A. W., Thomson, N. R., Ghazoui, Z. F., Hull, K. H., Wexler, M., Curson, A. R., Todd, J. D., Poole, P. S., Mauchline, T. H., East, A. K., Quail, M. A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S., y Parkhill, J.** 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* 7: R34.
- Yura, T., y Nakahigashi, K.** 1999. Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 153-158.
- Zahrán, H. H.** 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968-89, table.
- Zhan, H. J., Lee, C. C., y Leigh, J. A.** 1991. Induction of the second exopolysaccharide (EPS_b) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J. Bacteriol.* 173: 7391-7394.
- Zhan, H. J., Levery, S. B., Lee, C. C., y Leigh, J. A.** 1989. A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 that can function in root nodule invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86: 3055-3059.

