

F. J. ... 21/108 *79/66*

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento *618042157*
Nº Copia *1677690*

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Fecha *11-3-97*
ENTRADA NUM. *886*

Análisis y caracterización molecular del material genético adyacente a la región *nfe*, contenido en el plásmido críptico *pRmeGR4b* de *Rhizobium meliloti* GR4.

Sanae Zekri

Tesis Doctoral
1997

UNIVERSIDAD DE GRANADA
24 FEB. 1997
COMISION DE DOCTORADO

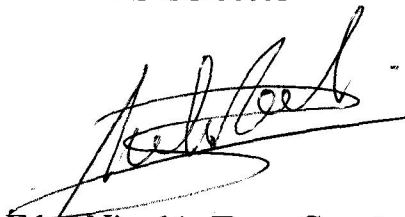
**Análisis y caracterización molecular del material genético
adyacente a la región *nfe*, contenido en el plásmido críptico
pRmeGR4b de *Rhizobium meliloti* GR4**

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias
Biológicas Doña Sanae Zekrí, para
aspirar al grado de Doctor

Fdo: Sanae Zekrí



V° B°
El Director



Fdo: Nicolás Toro García
Doctor en Ciencias biológicas
Investigador Científico del C.S.I.C

Indice

Introducción General	1
Plásmidos en los Rhizobiaceae	
1.- Introducción	3
2.- Generalidades sobre las funciones codificadas por los pSyms.	5
3.- Los plásmidos no-simbióticos	7
4.- funciones bióticas relacionadas con los plásmidos crípticos	10
5.- Factores que afectan la evolución plasmídica	11
6.- factores que afectan la evolución plasmídica	
a.- Transferencia mediante conjugación	15
b.- Reordenaciones genéticas	17
Concepto de la competitividad en <i>Rhizobium</i>	
1.- Introducción	18
2.- Posible solución a la problemática de la competitividad	19
3.- Adsorción de las bacterias a la raíz y su colonización	20
4.- Factores ambientales que afectan la competitividad	22
a.- La textura y estructura del suelo	23
b.- El pH	24
c.- Los niveles de Calcio	25
d.- La temperatura	26
e.- La humedad y la salinidad	27
f.- Uso de herbicidas y pesticidas	28
g.- Factores biológicos	28
5.- Leguminosas y cepas bacterianas con su rango de huésped alterado	29
6.- Genes bacterianos implicados en la competitividad por la nodulación	33
a.- Región <i>nfe</i> de <i>R. meliloti</i> GR4	34
a. 1.- Identificación de la región <i>nfe</i>	34
a. 2.- caracterización y estructura de los genes <i>nfe</i>	36
b.- Metabolismo de la prolina	38
c.- La producción de Rizopinas	39
d.- Producción de Bacteriocinas	41
7.- Caracteres fenotípicos de la bacteria que se relacionan con el proceso competitivo	

a.- Motilidad y velocidad de nodulación	42
b.-Biosíntesis de polisaccharidos de la superficie celular	43

Los elementos móviles de *Rhizobium*

1. Introducción	45
2.- Sistemas de identificación de las secuencias de inserción en <i>Rhizobium</i>	46
3.- Características de las secuencias de inserción	48
4.- Bases para la clasificación de las secuencias de inserción	49
a.- La familia IS3	50
b.- La familia IS4	52
5.- Control de la actividad de transposición	54
6.- Interes de las secuencias de inserción	
a.- Características de cepas	56
b.- Evolución de los genomas	58
7.- Secuencias intrónicas	59
a.- movilidad de los intrones	59
b.- ¿Porque iontrones en Procariotas?	60

Objetivo del trabajo 65

Material y Métodos

1.-Razas bacterianas y plásmidos	67
2.-Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos	
2.1.-Medios para Rhizobiacea	70
2.2.-Medios para <i>E. coli</i>	71
2.3.-Medios de conservación	72
3.-Antibióticos	72
4.-Métodos de conjugación	
a.-Cruces simples	72
b.-Cruces triparentales	73
5.-Aislamiento y purificación de ADN plasmídico	
a.-Magic Minipreps	73
b.- Magic Minipreps	74
c.-Minipreparación de plásmidos con bajo peso molecular	74
d.-Purificación de fragmentos de restricción	75
6.-Aislamiento de ADN total de <i>Rhizobium</i>	75
7.-Determinación de la concentración de ADN, ARN y oligonucleótidos	76

8.- Tratamiento enzimático del ADN	77
a.- Digestiones múltiples de ADN con endonucleasas de restricción	77
b.- Relleno de extremos 5' provenientes de una restricción	77
c.- Eliminación de extremos 3' provenientes de restricción	78
d.- Ligación de fragmentos de restricción	78
9.- Electroforesis de ADN	
a.- Separación e identificación de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa	79
b.- Revelado de geles y fotografía	79
c.- Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa	80
d.- Purificación de fragmentos de restricción por transferencia desde geles de agarosa a membranas de DEAE-celulosa	80
10.- Transformación de <i>E. coli</i>	
a.- Preparación de células competentes	81
b.- Transformación	82
11.- Electroporación de <i>E. coli</i> y <i>Rhizobium</i>	
a.- Preparación de las células de <i>E. coli</i>	82
b.- Preparación de las células de <i>Rhizobium</i>	83
c.- Electroporación	83
12.- Experimentos de hibridación ADN-ADN	84
a.- Marcaje de sondas	84
b.- Transferencia de ADN a filtros de nylon	85
c.- Hibridación y revelado	86
d.- Hibridación en colonia	86
13.- Obtención de clones de secuenciación	
a.- Estrategia	87
b.- Elección de los clones	92
c.- Purificación de los clones	93
14.- Secuenciación	94
a.- Metodo raiactivo	94
a.1.- Preparación y marcaje del ADN	94
a.2.- Determinación de nucleótidos cercanos al cebador	95
a.3.- Secuenciación de zonas con compresiones	96
a.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	96
a.5.- Tratamiento del gel y exposición	97
b.- Secuenciación automática	97
b.1.- Preparación y marcaje de las muestras	98
15.- Programas de ordenador utilizados para el análisis de secuencias	98

16.-Determinación de la transcripción de los genes <i>dap</i>	
a.- Extracción de ARN total	99
b.-Transcripción inversa	101
17.-Ensayos con planta	
a.-Planta	102
b.-Solución nutritiva	102
5.3.-Esterilización y germinación de semillas de alfalfa	103
5.4.-Cultivo axénico de plantas de alfalfa	103
5.5.-Determinación de la cinética de nodulación	104
5.6.-Reaislamiento de <i>Rhizobium</i> de los nódulos	104
5.7.-Medida de la competitividad para la nodulación	105
g.1- Cepas identificables por su resistencia a antibióticos	105
g.2.- Cepas marcadas con el gen <i>gus</i>	106
g.3.- Medida de la estabilidad de plásmidos	106

Capítulos de Resultados y Discusión

Delimitación de la mínima región, conteniendo los genes *nfe*, implicada en competitividad y eficiencia de nodulación de la cepa Rm2011

Resumen	112
Introducción	112
Resultados	
1.- Uso de la actividad b-glucuronidasa (GUS) en ensayos de competitividad	114
2.- Transferencia de la región <i>nfe</i> a la cepa 2011 de <i>R. meliloti</i>	116
a.- Competitividad por la nodulación de Rm2011 y derivados	116
b.- Determinación de la eficiencia de nodulación de Rm2011 y derivados	123
Dicusión	127

Genes de la biosíntesis de lisina localizados en el plásmido pRmeGR4b

Resumen	131
Introducción	132
Resultados	
1.- Descripción de la secuencia	135

2.- Análisis de la secuencia de aminoácidos	138
3.- Presencia y distribución de los genes <i>dapA</i> y <i>dapB</i> localizados en el plásmido pRmeGR4b en <i>R. meliloti</i>	145
4.- Complementación de los mutantes DapA y dapB de <i>E. coli</i>	152
5.- Transcripción de los genes <i>dapA</i> y <i>dapB</i> del plásmido pRmeGR4b	154
Discusión	156

Los elementos móviles del plásmido pRmeGR4b

Identificación y secuencia de nucleótidos del elemento de inserción *ISRm6* de *Rhizobium meliloti*, elemento transponible que pertenece a la familia IS3

Resumen	161
Resultados	
1.- Descubrimiento de la secuencia de inserción <i>ISRm6</i>	162
2.- distribución de <i>ISRm6</i> en <i>Rhizobium</i>	166
3.- Determinación de la actividad de transposición	171
Discusión	176

Identificación y secuencia de nucleótidos del elemento de inserción *ISRm7* localizado en el plásmido pRmeGR4b de *Rhizobium meliloti* GR4

Resumen	179
Resultados	
1.- Análisis de la secuencia de inserción <i>ISRm7</i>	179
2.- Número de copias de <i>ISRm7</i>	184
Discusión	188

Caracterización de un nuevo elemento de inserción denominado *ISRm8* en el plásmido pRmeGR4b de *Rhizobium meliloti* GR4

Resumen	191
Resultados	
1.- Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del elemento <i>ISRm8</i>	192
2.- Distribución de <i>ISRm8</i> en <i>Rhizobium</i>	197

La asociación del intrón RmInt1 del grupo II con elementos de inserción del tipo *ISRm2011-2* pertenecientes a la familia IS3 deriva en su abundante distribución en *Rhizobium meliloti*

Resumen	202
Introducción	203
Resultados	
1.- Identificación del nuevo miembro del grupo II de intrones: Rmint1	205
2.- Estructura secundaria del RNA de RmInt1	208
3.- Distribución del RmInt1 entre las poblaciones naturales de <i>R. meliloti</i> y su asociación con <i>ISrm2011-2</i>	211
4.- Movilidad de la construcción <i>ISRm2011-2::RmInt</i> en poblaciones de <i>R. meliloti</i>	216
5.- Determinación del nuevo sitio de inserción del intrón RmInt1	217
Discusión	220

Identificación y caracterización de un nuevo miembro de la superfamilia IS:4: *ISRm4s*, interrumpido por una secuencia de inserción de la familia IS21 que se denomina *ISRm9*

Resumen	224
Resultados	
1.- Detalles de las secuencias de inserción <i>ISRm9</i> e <i>ISRm4S</i>	225
2.- Número de copias de <i>ISRm4S</i> e <i>ISrm9</i>	234
Discusión	235

Conclusiones	238
---------------------	-----

Bibliografía	240
---------------------	-----



Introducción general

El N₂, aunque desde un punto de vista cuantitativo, es uno de los elementos mayoritarios en la biosfera constituyendo entre el 8 y el 10% de la materia viva, es sin embargo, junto con el agua el factor limitante más común para las plantas. A pesar de su abundancia en la atmósfera, 78% en forma de nitrógeno molecular, no es directamente utilizable por la mayoría de los seres vivos por su elevado carácter inerte. Existe un conjunto de microorganismos procariotas denominados diazotrofos capaces de reducir el dinitrógeno atmosférico a amonio, proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Los microorganismos que llevan a cabo este proceso pueden ser fijadores en vida libre como lo son bacterias pertenecientes a los generos *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*; o bien fijadores en simbiosis como es el caso de los generos *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* que constituyen la familia Rhizobiaceae caracterizada por originar nódulos radicales o bien hipertrofias corticales en tallos u hojas de diversas plantas, fundamentalmente leguminosas. Esta simbiosis se considera la de mayor significación agronómica por la naturaleza de las plantas implicadas, indirectamente relacionadas con la salud por su estrecha relación con la alimentación y la mejor conservación del medio. Las simbiosis suministran al suelo el 80% del nitrógeno fijado de forma estable. El resto del N₂ fijado biológicamente, si bien importante en cantidad, revista poca significación agrícola a causa de su pérdida por lexicación.

La simbiosis establecida entre las bacterias del género *Rhizobium* y las leguminosas se caracteriza por su alto grado de especificidad, así las bacterias aisladas de los nodulos de una especie de leguminosa son generalmente capaces de interaccionar con una o muy pocas plantas del mismo grupo, pero no con las de otro

grupo distinto. El proceso de infección de una leguminosa huésped por su rizobio específico sigue una serie secuencial de etapas, empezando por el crecimiento de las bacterias en la rizosfera de la planta hasta desarrollarse el estado bacteroide responsable de la fijación de N_2 .

La colonización de la rizosfera de una leguminosa por su rizobio específico (fenotipo **Roc**) se encuentra estimulada por los exudados radicales de la planta. Estos exudados entre cuyos componentes activos se encuentran flavonas, isoflavonas o betainas atraen por quimiotaxis a la bacteria activando al mismo tiempo sus genes *nod*; cuya expresión conduce a la síntesis de señales o factores nod (quitoolipooligosacáridos) que provocan una deformación de los pelos radicales en el seno de la planta (fenotipo **Hac**). La curvatura de la parte apical del pelo radical conlleva a la penetración de la bacteria en su interior a través de la pared celular (fenotipo **Inf**), seguida por la formación del canal de infección y la iniciación del nódulo. Los cordones de infección conducen las bacterias hasta el citoplasma de las células vegetales del cortex (fenotipo **Bar**), ahí donde se diferenciarán en su forma endosimbiótica de bacteroides (fenotipo **Bad**) y serán las encargadas de llevar a cabo la fijación de N_2 (fenotipo **Nif**).

La capacidad de fijar nitrógeno se debe a la actividad de un complejo enzimático llamado dinitrogenasa, de estructura y propiedades muy similares en todas las especies en las que se ha estudiado. Este complejo se compone de dos proteínas inactivas por separado (componentes I y II), generalmente una contiene hierro y molibdeno mientras que la otra sólo tiene hierro, denominadas nitrogenasa y nitrogenasa reductasa, respectivamente. Como estos últimos nombres indican, la ferroproteína, activada por ATP-Mg, reduce la nitrogenasa que a su vez, a través del cofactor hierro molibdeno, distribuye los electrones. La producción de hidrógeno es concomitante con la reducción de nitrógeno y supone una pérdida de eficiencia de la

en plásmidos, llamados tradicionalmente plásmidos simbióticos o pSyms. En cualquier caso, una gran parte del ADN extracromosómico lleva funciones hasta ahora desconocidas tanto en los pSyms como en los denominados plásmidos no-pSym o crípticos. Tanto los plásmidos tipo pSym como los no-pSym se mantienen estables a lo largo de las generaciones, lo que sugiere la presencia de un mecanismo preciso que asegura la igualdad de partición entre las células hijas. El hecho de que la replicación del cromosoma rizobiano sucede al mismo tiempo que la de los plásmidos que este lleva, implica una regulación coordinada de estos fenómenos en la cual pueden verse involucradas secuencias comunes. Sin embargo, se desconoce la manera en la cual se logra dicha coordinación.

Por otro lado, el mantenimiento de los plásmidos en las células bacterianas de una manera estable, a pesar del gasto energético que esto supone, y aún en ausencia de las condiciones selectivas para las cuales pueden conferir alguna ventaja, despierta el interés sobre el papel que están ejerciendo dentro del microorganismo y la importancia que puedan tener sobre la supervivencia de la especie. Esto, añadido a los conocimientos que ya se tienen sobre la implicación de los plásmidos tanto en los procesos simbióticos, como en los que puedan desarrollarse en la vida libre de las bacterias portadoras, los hace objeto de estudio en distintos laboratorios con el fin de un mejor aprovechamiento del sistema fijador en el caso de la interacción *Rhizobium-leguminosa*.

Una manera de analizar las funciones codificadas por los plásmidos implica el aislamiento de derivados curados de alguno o todos los plásmidos llevados originalmente por la cepa salvaje. Uno de los procedimientos para alcanzar este objetivo es por tratamiento con calor, o bien mediante uso de nuevos métodos que permiten la selección positiva a la hora de perderse alguna de las funciones (Hynes *et al.* 1989; Flores *et al.* 1993). Estos métodos permitieron un análisis sistemático de

(Sharma & Laxaminarayama, 1989) y *Bradyrhizobium* (Haugland & Verma, 1981; Haugland et al. 1984) donde los genes simbióticos no se hallan ubicados en ningún plásmido. Además, hay que añadir que no todos los rizobios tienen plásmidos, este parece ser el caso de *Azorhizobium* (van den Eede et al. 1987), lo que sugiere que en este género los genes simbióticos se sitúan en el cromosoma.

Como consecuencia lógica de su gran tamaño molecular, otros genes no-simbióticos pueden encontrarse también en los pSyms. De esta manera en estos plásmidos se hallan localizados por ejemplo los genes *trc* implicados en el catabolismo de la trigonelina y que permiten la utilización de este compuesto como única fuente de carbono y de nitrógeno por parte de la cepa que lo lleva (Boivin et al. 1990). En los pSyms de *R. tropici* se localizan también los genes *pcsA* que codifican para la citrato sintetasa; mutaciones en estos genes reducen la correspondiente actividad enzimática acompañada de una reducción de la capacidad de nodulación de las cepas. Además se ha propuesto una implicación de estos plásmidos en la toma de hierro (Pardo et al. 1994).

Por otra parte, el suelo contiene diversos componentes aromáticos originados por los exudados radicales y la degradación de las plantas. Estos compuestos intervienen en la interacción *Rhizobium*-leguminosa como inductores para el desarrollo de los nódulos (Schultze et al. 1994), como agentes quimioatrayentes (Parke et al. 1985) y como fuente de carbono para *Rhizobium* (Parke & Ornston, 1984, Hartwig et al. 1991). Así, se ha descrito que la capacidad para metabolizar el catecol está codificada por el plásmido Sym en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Baldani et al. 1992). Dicha capacidad está codificada por el plásmido pSym WE14-2 que se ha visto involucrado en la utilización del compuesto aromático catecol así como en actividades enzimáticas definidas y en la utilización de nitrato.

En el suelo, los exudados radicales de la planta representan una fuente de nutrientes para los microorganismos. Genes requeridos para el catabolismo de algunos de estos componentes han sido localizados en los plásmidos de la especie *Rhizobium*. En la misma especie se ha visto que los genes responsables del catabolismo de las betainas excretadas por *Medicago sativa*, están contenidos en el plásmido Sym (Goldman *et al.* 1991). Las cepas bacterianas que adquieren este tipo de genes presentan una ventaja selectiva sobre los demás microhabitantes de la rizosfera. Por esta razón, estos genes corresponden a la clase de componentes genéticos frecuentemente encontrados dentro de los genomas rizobianos (García-de los Santos *et al.*, 1996).

3.- Los plásmidos no-simbióticos

Los plásmidos crípticos o no-pSym se definen como aquellos que no llevan genes esenciales para el establecimiento del estado simbiótico (Mercado-Blanco & Olivares, 1996). Sin embargo, en algunos casos estas construcciones modulan la interacción entre el macro- y el microsimbionte ya sea de manera positiva o negativa. Se sabe muy poco sobre este ADN silencioso aunque ahora es factible adjudicar algunas funciones bien definidas a la presencia de determinados plásmidos, de hecho algunas características han sido reveladas mediante ensayos donde han de competir cepas parentales y sus derivadas curadas de algunos plásmidos.

Estos plásmidos pueden llevar repeticiones de los genes simbióticos como *nod* y *nif* (Barran & Bromfield, 1988). También en *R. meliloti* 1076, se encontraron repeticiones en los genes *nodB* y *nodC* en el plásmido pSV1; y de la misma manera, se encontraron reiteraciones de los genes *nifE* y *nifB* (Rastogi *et al.* 1991). Una

posible explicación de esta causa puede ser que, por su capacidad de autotransmisión, los plásmidos crípticos sean los sitios idóneos para recibir porciones de plásmidos simbióticos provenientes de otros rizobios (Young & Wexler 1988), o simplemente sean los receptores de repeticiones de algunos genes que provengan de la recombinación de sus propios pSyms (Brom *et al.* 1991; Romero *et al.* 1991).

Cada vez son mas frecuentes los estudios que ponen de manifiesto la existencia en los denominados plásmidos no-simbióticos de determinantes genéticos relacionados con algunas propiedades simbióticas. Así por ejemplo, se ha demostrado la implicación de estos plásmidos en la síntesis de bacteriocinas ligadas a la especificidad del proceso competitivo (Hirsch, 1979; Johnston *et al.* 1982). En algunos casos la capacidad de nodulación está normalmente controlada por genes localizados en los plásmidos no simbióticos como es el caso en judías (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990). También se ha notado que los plásmidos no simbióticos de *R. leguminosarum* CFN299 aumentaron la nodulación de los transconjugantes de *A. tumefaciens*, de hecho estos transconjugantes nodulan mejor y fijan más nitrógeno cuando llevan todos los plásmidos naturalmente encontrados en la cepa CFN299 en comparación con los transconjugantes conteniendo únicamente los plásmidos simbióticos (Martínez *et al.* 1987). Para la nodulación de *Phaseolus vulgaris*, se requiere la presencia del plásmido b, además del plásmido d que contiene los genes *nod* y *nif* (Brom *et al.*, 1992).

Un análisis de los derivados curados de plásmidos en distintas cepas, entre ellas *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Hynes, 1990), *R. etli* (Brom *et al.*, 1992) *R. fredii* (Barbour & Elkan, 1990) y *R. meliloti*, demuestra la existencia de genes implicados en la competitividad y la eficiencia de nodulación en los distintos plásmidos crípticos. De hecho, estas cepas curadas presentan un nivel bajo en competitividad y eficiencia de nodulación en comparación con sus correspondientes cepas parentales. Genes

ligados al plásmido pRmeGR4b, denominados *nfe*, han sido relacionados directamente con la eficiencia de nodulación y la capacidad competitiva de la cepa de *R. meliloti* GR4 (Toro & Olivares, 1986; Sanjuan & Olivares, 1989). Son diversos los ejemplos que demuestran el beneficio que supone para el genoma hospedador la transferencia de plásmidos. El nivel competitivo de cepas transconjugantes derivadas de *R. etli*, se ve incrementado gracias a la transferencia de un plásmido de *R. tropici* (Martínez-Romero & Rosenblueth, 1990).

La complementación de las bacterias con alguno de los plásmidos crípticos, aunque ventajosa en la mayoría de los casos, puede sin embargo llegar a tener un papel negativo sobre el proceso simbiótico de las cepas receptoras. Un ejemplo de este comportamiento fue observado en *R. loti* donde las cepas curadas de los plásmidos presentan una competitividad y una eficiencia de nodulación mayores a las detectadas en la cepa salvaje (Pankhurst *et al.* 1986). Similar comportamiento se observó en la cepa SAF22 de *R. meliloti*, la presencia de los plásmidos crípticos atenua la habilidad normal de llevar a cabo el desarrollo de los nódulos y una simbiosis efectiva con las raíces de alfalfa (Velázquez *et al.* 1995). Selbitschka y Lotz en el año 1991 determinaron la presencia de algunos genes en los plásmidos crípticos de *R. leguminosarum* bv. *viciae* implicados en la reducción de la eficiencia en la fijación de nitrógeno cuando se establece esta simbiosis con guisantes; sin embargo el poder fijador de la bacteria no se ve afectado cuando la planta hospedadora es *Vicia faba*.

4.- Funciones bióticas relacionadas con la presencia de los plásmidos crípticos

Entre las funciones metabólicas codificadas por los plásmidos crípticos se destaca la utilización de algunos componentes orgánicos como fuentes de carbono, principalmente en el estado de vida libre. Un buen ejemplo de ello es la involucración del plásmido pRme41a de *R. meliloti* en el metabolismo de calisteginas (Tepfer *et al.*, 1988; Boivin *et al.*, 1990). Los genes *cac* responsables de este catabolismo no son esenciales para el establecimiento del proceso simbiótico, pero que se sospecha confieren una ventaja selectiva durante la vida saprofítica de la bacteria (Boivin *et al.*, 1990). También se han descrito múltiples ejemplos en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que relacionan los plásmidos pRtrW41- 2a, 2b y 2c con el crecimiento de la bacteria en presencia de distintas fuentes de carbono (Baldani *et al.*, 1992). Por otro lado, los genes responsables de la producción de melenina, descritos en distintas bacterias del género *Rhizobium*, tienen una localización genómica variable según las cepas. Así, en la cepa GR4 de *R. meliloti* los genes *mel* se localizan en el plásmido pRmeGR4b (mercado-Blanco *et al.*, 1993).

La presencia de los plásmidos crípticos también se ha visto implicada en la supervivencia de las células en la rizosfera. Así Moënné-Loccoz y Weaver (1995), demostraron que el papel que juegan los plásmidos llevados por la cepa W14-2 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, en la supervivencia de la cepa no se hace evidente cuando en experimentos de inoculación individual de las cepas curadas, ya que los resultados que se obtienen no difieren de aquellos de la cepa parental. Sin embargo, cuando la bacteria curada se coinocula con la cepa salvaje, se observa un notable descenso en el número de células que no llevan los plásmidos, indicando la clara implicación de estos en el crecimiento y desarrollo celular.

5.- Genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos de localización plasmídica

En los seres vivos, la biosíntesis de lisina se realiza por dos vías metabólicas totalmente distintas. En plantas, bacterias y algas se forma la lisina via decarboxilación del meso isómero del ácido α - ϵ -diaminopimélico (DAP), que a su vez deriva de la condensación del aspartato con el piruvato (**fig.2A**), mientras que los hongos y las levaduras usan el ácido α -aminoadípico como intermediario clave en su ruta (**fig.2B**). Puesto que el aspartato contribuye en la formación del esqueleto carbónico del DAP, lisina, metionina, treonina e isoleucina, estos aminoácidos han sido denominados colectivamente como de la familia del aspartato, aunque hay que destacar que la lisina (y por consiguiente el ácido α - ϵ -diaminopimélico) y la isoleucina se consideran sólo en parte como componentes de esta familia ya que derivan realmente del piruvato.

El mecanismo de biosíntesis de lisina en bacterias es de especial interés no sólo por su relevancia en los estudios de regulación en la ramificada ruta biosintética de este aminoácido, sino también por la asociación que tiene el ácido diaminopimélico (DAP) con la estructura de la pared celular de las bacterias. El DAP es un precursor del peptidoglucano que a su vez es fundamental en la formación de los enlaces de la pared celular de distintas cepas bacterianas como por ejemplo en *E. coli*. En esta bacteria, la biosíntesis del peptidoglucano anclado a la pared celular (mureina) es un proceso complicado donde el precursor fundamental es un disacárido pentapeptídico constituido por el ácido diaminopimélico. Además, el ácido dihidrodipicolínico, un intermediario en la ruta biosintética de la lisina, actúa como precursor del ácido dipicolínico que a su vez es un constituyente sustancial de las

Fig.1. Biosíntesis de lisina en bacterias y levaduras. **(A)** Ruta biosintética del ácido diaminopimelato y la lisina en bacterias. Los genes que aparecen indicados en el esquema corresponden a los de *E. coli*. *dapA*: dihidrodipicolinato sintasa, *dapB*: dihidrodipicolinato reductasa, *dapC*: tetrahidrodipicolinato succinilasa, *dapD*: succinil diaminopimelato aminotransferasa, *dapE*: succinil diaminopimelato succinilasa, *lysA*: diaminopimelato decarboxilasa, PALP: piridoxal fosfato. **(B)** Vía de síntesis de lisina en levaduras y hongos (descrita en *Saccharomyces cerevisiae*, *S. lipolytica* y en *Neurospora crassa*). Los genes que se describen corresponden a los de *S. cerevisiae*. *Lys7*: homocitrato deshidratasa, *Lys4*: homo-cisaconitato hidratasa, *Lys12*: homoisocitrato deshidrogenasa, *Lys5* y *Lys2*: α -aminoadipato reductasa, *Lys9*: sacaropina reductasa y *Lys1*: sacaropina dehidrogenasa.

esporas, sobre todo en micobacterias (Cirillo *et al.*, 1994). Las micobacterias se caracterizan por su alto potencial inmunológico gracias a la estructura de su pared celular, única entre los microorganismos, por la constitución de su peptidoglucano que tiene, además de los enlaces DAP-D-alanina usuales en todas las bacterias, enlaces inter-DAP (Cirillo *et al.*, 1994). Por todo esto, los genes de biosíntesis de la lisina son indispensables para las cepas de esta especie de manera que cualquier alteración en alguno de los genes DAP resulta ser letal para la bacteria.

La expresión de los genes *dap* y *Lys*, para la biosíntesis de lisina en bacterias y levaduras respectivamente, se regula mediante un control específico de lisina pero también está sometida al control general de síntesis de aminoácidos en la célula. El uso de un mecanismo de control u otro depende de los microorganismos en cuestión y de los genes implicados en esta ruta, así por ejemplo Urrestarazu *et al.* (1985) demostraron que los genes implicados en las etapas finales de la ruta metabólica de la lisina (a partir del α -aminoadipato) en *Saccharomyces cerevisiae* respondían al control general de síntesis de aminoácidos. Sin embargo, esto no parece ser el caso de los genes que llevan a cabo las primeras etapas de esta síntesis. Además, los mismos autores encontraron que seis de las ocho enzimas codificadas por los genes *Lys* se reprimen por adición de lisina al medio de cultivo, lo que significa un control de la síntesis por exceso del producto. Este mecanismo de control se observa en distintos microorganismos e incluso en algunos cereales, como por ejemplo en maíz donde se identificó un mutante alterado en el mecanismo sensitivo a la acumulación de lisina, y que resulta ser capaz de duplicar la cantidad de este aminoácido en el endospermo (Habben *et al.*, 1995).

La excepción a estos mecanismos de control lo presentan las cepas que pertenecen a la especie *Bacilli*, así la inhibición de la actividad dihidrodipicolinato

sintasa por acumulación de la lisina persiste durante el desarrollo de las células de *B. subtilis*, pero desaparece en la época de la esporulación (Umbarger, 1978). Durante esta época y con el fin de limitar la acumulación de lisina en la célula y mantener al mismo tiempo la síntesis del *meso*-diaminopimelato, se altera la actividad de la enzima diaminopimelato decarboxilasa que controla la última etapa de la ruta biosintética de la lisina.

La organización de los genes implicados en la biosíntesis de lisina depende de las especies donde se han descrito. Por ejemplo en *Brevibacterium lactofermentum*, los genes *dapA* y *dapB* se encuentran agrupados en un operon junto con otro ORF denominado *orf2* cuyo producto queda por determinar (Pisabarro *et al.*, 1993); lo mismo ocurre en *Bacillus subtilis* donde tres de los genes de esta ruta se transcriben en una unidad (Chen *et al.*, 1993). Sin embargo, en *E. coli* los genes DAP están dispersos dentro del cromosoma de la bacteria (Bukhari & Taylor, 1971).

6.- Factores que afectan la evolución plasmídica

a.- Transferencia mediante conjugación

El proceso de transferencia plasmídica exige la superación de muchas barreras; además de las dificultades del proceso de transferencia, el plásmido tiene que superar los sistemas de modificación-restricción así como la incompatibilidad con los plásmidos ya presentes en la bacteria hospedadora. Frecuentemente no son tenidos en cuenta los efectos que la replicación de nuevos plásmidos ejerce sobre la célula receptora. Experimentos realizados en *E. coli* demuestran que la introducción de un nuevo plásmido dentro de la célula causa en esta última efectos negativos y que

este deterioro no se ve corregido hasta 500 generaciones más tarde en condiciones selectivas, aunque este estado de estabilización permanece luego incluso en condiciones no selectivas (Levin, 1993). Los cambios responsables de este proceso de restauración para aceptar la integración de un nuevo plásmido, afectan tanto a la bacteria hospedadora como al plásmido integrado, de manera que ambas partes puedan coevolucionar al mismo tiempo.

La transferencia mediante conjugación se observa entre cepas de *R. leguminosarum* tanto en condiciones de laboratorio (Johnston *et al.* 1982, Geniaux & Amarger, 1993) como en condiciones similares a las del campo (Kinkle & Schmidt, 1991, Rao *et al.* 1994). La frecuencia de transferencia de los plásmidos depende de su tamaño y de la información genética que llevan (García-de los Santos *et al.* 1996). Además de ser autotransmisibles, algunos de los plásmidos incluso inducen la transferencia de otros replicones (Johnston *et al.* 1982, Mercado-Blanco & Olivares, 1993).

El análisis de las características cromosomales y plasmídicas de algunas biovariedades de *R. leguminosarum* como *trifolii* (Schofield *et al.*, 1987), *phaseoli* (Geniaux *et al.*, 1993) y *viciae* (Young & Wexler 1988) así como *R. galegae* (Kaijalainen & Lindstrom 1989) apoyan la idea de un intercambio plasmídico en la naturaleza. Los análisis teóricos de estos resultados sugieren que entre un 10% (en el caso de *R. galegae*) y hasta un 15 a 30% (caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae*) del material genético de estas cepas resulta de una transferencia genética hacia estas bacterias o bien que ellas mismas han servido como fuente de material exportado hacia otras cepas (Valdés & Piñero, 1992). Por esta razón, se sospecha que el fondo genético actualmente conocido de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* proviene de la transferencia de material genético a partir del pSym de *R. etli* (Segovia *et al.* 1993).

Estos resultados revelan claramente el importante papel de la transferencia de los plásmidos en la estructuración de nuevos genotipos rizobianos.

b.- Reordenaciones genéticas

Como residentes bacterianos particularmente dinámicos, los plásmidos están sujetos a frecuentes reordenaciones estructurales (Romero *et al.* 1995a). Una alta frecuencia de reordenamientos ha sido observada en plásmidos de varias especies rizobianas (Djordjevic *et al.* 1982, Brom *et al.* 1991, Romero *et al.* 1991, 1995b, Selbitschka & Lotz 1991, Rastogi *et al.* 1992, Flores *et al.* 1993). Esta dinámica incluye distintos fenómenos como la cointegración, la translocación, la delección o amplificación de secuencias específicas, cuyo resultado representa un aporte en la generación de la biodiversidad estructural (Romero *et al.* 1995a); todo esto seguido de las recombinaciones que suceden entre las distintas secuencias parece ser el responsable de más diversidad. Aunque muchos estudios enfocan la plasticidad exhibida por los pSyms (Brom *et al.* 1991, Selbitschka & Lotz 1991, Flores *et al.* 1993), presumiblemente por ser los más estudiados, los reordenamientos conciernen también los plásmidos no-pSyms

Mientras sigue sin establecerse la función biológica de la mayoría de las reordenaciones, algunas de ellas parecen tener efectos beneficiosos para la célula hospedadora. De hecho delecciones producidas naturalmente en el plásmido críptico de *R. leguminosarum* bv. *viciae* conlleva a una eficiencia en la nodulación de cepas inicialmente no infectivas (Selbitschka & Lotz, 1991). En algunas cepas de *R. etli*, amplificaciones en el plásmido pSym conducen a un aumento en la fijación de N₂ (García-de los Santos *et al.* 1996). Además, se describe la generación de un plásmido

simbiótico híbrido mediante recombinación de los distintos pSyms (Christensen & Sechuber, 1983).

Concepto de la competitividad en *Rhizobium*

1.- Introducción

Se entiende por competitividad, la capacidad de una estirpe en formar nódulos, con una determinada leguminosa, en presencia de otras estirpes de rizobios.

La inoculación de las leguminosas con cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es una práctica agrícola mundialmente extendida, y se utiliza para aumentar la cosecha de estas plantas sin la necesidad de añadir fertilizantes nitrogenados, costosos y considerados como una de las fuentes contaminantes de las aguas subterráneas. Aunque se dispone de inoculantes comerciales desde finales del siglo pasado, no se ha demostrado que estos sean efectivos en suelos con cepas autóctonas, muy bien adaptadas a su nicho ecológico. Esto ocurre incluso cuando los niveles de inóculo son muy superiores a los de rizobios indígenas existentes en el suelo.

El éxito de los inoculantes rizobianos requiere que las estirpes sean altamente eficientes en fijar nitrógeno y al mismo tiempo altamente competitivas. Con los conocimientos actuales sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, resulta posible alcanzar el primer objetivo aunque el segundo representa todavía una barrera para el desarrollo de fertilizantes nitrogenados perfeccionados. Generalmente la inoculación con *Rhizobium* se hace en situaciones donde el suelo tiene una población de rizobios baja o casi nula, o bien en suelos cuyas poblaciones establecidas sean ineficientes. Frecuentemente, el uso de inoculantes rizobianos para resolver el primer problema

conlleva al segundo por causa de la baja eficiencia de las cepas introducidas. El problema de la competitividad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas ha sido objeto de revisiones recientes por Streeter (1994) y Toro (1996).

2.- Posible solución a la problemática de la competitividad

El problema planteado por la competitividad entre las cepas de *Rhizobium* se ha venido abordando fundamentalmente de dos maneras, por un lado alterando el rango de hospedador de las cepas de *Rhizobium* y/o usando genotipos de leguminosas con infectividad restringida; o por otro lado, construyendo cepas de *Rhizobium* altamente competitivas para la nodulación. La realización de inoculaciones masivas repetidas veces durante varios años para conseguir la persistencia del inóculo en el suelo y la facilitación, de esta manera, del posible desplazamiento de las cepas autóctonas, se considera también una de las alternativas usadas para favorecer a la cepa introducida como inoculante.

Finalmente, y para obtener los mismos resultados en la competitividad de las cepas introducidas, se puede proceder a la realización de un control químico de la nodulación haciéndola, por ejemplo, independiente de la presencia de flavonoides a la vez que se utilizan inhibidores de la inducción de los genes *nod* en las cepas indígenas (Spaink *et al.*, 1989; Kossiak *et al.*, 1990; Cunningham *et al.*, 1991). De hecho, ya se han aislado genes *nod* (por ejemplo: *nodD*, Spaink *et al.*, 1989) capaces de activar los genes de la nodulación en ausencia de los flavonoides. Esta técnica que consiste en inocular la leguminosa con una cepa que contenga el gen *nodD* flavonoide-independiente y al mismo tiempo un inhibidor de la inducción del gen *nod* de las cepas indígenas, se enfrenta con dos obstáculos: el primero es la inestabilidad

de los inhibidores de los genes *nod* en el suelo, y el segundo es la necesidad de la aplicación de varios inhibidores para cubrir la variabilidad que existe entre los genes *nod* de las distintas cepas del suelo, lo cual hace encarecer el proceso.

En la competencia por la nodulación podemos distinguir dos fases, una primera etapa en la que las distintas cepas compiten para colonizar el suelo y la rizosfera, y que depende fundamentalmente de factores edáficos; y una segunda etapa en la que la competencia se centra en colonizar la raíz y formar nódulos, mucho más dependiente de las características propias del rizobio y la leguminosa.

3.- Adsorción de las bacterias a la raíz y su colonización

La asociación simbiótica entre *Rhizobium* y plantas leguminosas se caracteriza por la penetración de la bacteria dentro de los tejidos radiculares de la planta y su invasión. Una etapa muy temprana en esta asociación es la atracción de las bacterias hacia la superficie radicular donde empiezan por colonizar primero la rizosfera para, posteriormente, unirse y adherirse a los pelos radicales causando su deformación y el desarrollo del nódulo. Algunos autores apuntan hacia el desarrollo de la especificidad rizobio-hospedador desde la etapa de adsorción (Stacey *et al.* 1980, Dazzo *et al.* 1984, Caetano Anollés & Favelukes, 1986b). Sin embargo, otros autores señalan la no especificidad en el mecanismo de la adsorción (Badenoch-Jones *et al.*, 1985, Mills & Bauer, 1985, Vesper & Bauer, 1985, Caetano Anollés & Favelukes, 1986a, Smit *et al.*, 1986). Experimentos realizados con alfalfa demostraron que bacterias homólogas a *R. meliloti* se unen a la superficie radicular de una manera específica, mientras que las bacterias heterólogas lo hacen de modo inespecífico (Caetano Anollés, G. &

Favelukes, G. 1986b). En estos estudios, la adición de las bacterias heterólogas conlleva a una reducción parcial en la adsorción de *R. meliloti* por alfalfa, mientras que la puesta en contacto de las raíces con bacterias homólogas inhibe totalmente el proceso de adsorción de *R. meliloti* (Caetano Anollés, G. & Favelukes, G. 1986b).

En algunas asociaciones bacteria-planta, la unión a la raíz requiere la presencia de cationes divalentes. De esta manera, la unión de *Pseudomonas fluorescens* a las raíces de rábano (James *et al.*, 1985) y de *Pseudomonas tolaasii* a las de cebada (Nissen, 1973) se estimula en presencia de calcio y magnesio. Esta ventaja dada por la presencia de iones depende básicamente del tipo de asociación, así la unión de *Agrobacterium tumefaciens* a células de planta en suspensión, se inhibe en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Ohyama *et al.*, 1979), lo mismo sucede con *Azospirillum brasilense* y raíces de trigo (Gafny *et al.*, 1986). Smit y colaboradores (1986, 1987), demostraron que la adsorción de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a los pelos radicales de guisante requieren tanto la presencia de Ca^{2+} como de condiciones neutras de pH.

Distintos experimentos han sido llevados a cabo con el fin de determinar el número de bacterias adsorbidas, utilizando herramientas como el microscopio óptico o electrónico (Stacey *et al.* 1980, Dazzo *et al.* 1984, Badenoch-Jones, *et al.* 1985), o bien mediante contaje de bacterias marcadas radiactivamente (Lafrenière *et al.* 1984, Badenoch-Jones, *et al.* 1985) o simplemente haciendo contaje en placa de células liberadas de las raíces por sonicación (Robertson *et al.* 1981, Jansen van Rensburg & Strijdom, 1982). Aunque *R. meliloti* persiste en el suelo en bajo número (Bottomley, 1992), este último se ve aumentado durante el periodo de crecimiento de la planta por la liberación de bacterias procedentes de los nódulos en desintegración (Weaver *et al.*, 1972; Weaver & Frederick, 1972 y 1974; Barber, 1982; Kuykendall *et al.*, 1982; Hiltbold *et al.*, 1985; Brockwell *et al.*, 1987), en cualquier caso, solamente una

pequeña parte de la población rizobiana total puede determinarse en el suelo por los métodos microbiológicos usados habitualmente (Kingsley & Bohlool, 1981), probablemente en parte por la adhesión de las bacterias a las partículas del suelo (Ozawa & Yamaguchi, 1986).

Se sabe ya bastante sobre las moléculas señales que intervienen en la interacción *Rhizobium*-leguminosa (Dénarié et al., 1992), sin embargo son escasos los conocimientos que se tienen sobre el mecanismo que favorece la colonización de la raíz (Beattie & Handelsman, 1993, Bolton et al., 1993, Triplett & Sadowsky, 1992). Para entender este mecanismo se requiere una coordinación y agrupamiento de todos los conocimientos obtenidos actualmente para cubrir todos los factores que afectan la interacción simbiótica como por ejemplo, los compuestos exudados por las raíces, que contienen fuentes carbonadas y nitrogenadas asimilables por la bacteria (ácidos orgánicos, prolina y derivados) (Jimenez-Zurdo et al., 1995; 1997) o bien los factores que estimulan el crecimiento (vitaminas) o las señales bioquímicas que regulan el proceso de interacción (flavonoides) (Phillips & Streit, 1996).

4.- Factores ambientales que afectan la competitividad

En el campo, tanto plantas como bacterias utilizan el suelo no sólo como soporte físico sino también como fuente de energía y nutrientes. Por esta razón no es sorprendente que las características de este suelo influyen sobre la supervivencia y la competición de la población bacteriana indígena, y mucho más afectada se ven aquellas de la cepa introducida. En esta situación, el proceso de nodulación también depende de factores medioambientales tales como el pH, la temperatura, la presencia de iones como el aluminio, el manganeso o el nitrato, pero también depende de las

separación o agregación de los componentes del suelo, los ejercen también los microorganismos como puede ser el caso de lombrices que abren canales que luego facilitan el crecimiento de las raíces.

b.- El pH

Se sabe que suelos con pH neutro o ligeramente alcalino favorecen la nodulación, pero a medida que baja el pH muchas leguminosas se muestran incapaces de ser noduladas. El contenido en carbono de los exudados radicales en suelos ácidos desciende notablemente, y esto conlleva consigo una reducción en el aporte de sustrato para los microorganismos residentes en la rizosfera. Paralelamente, en estos suelos el bajo pH conduce a una reducción de la concentración en fosfato, calcio y molibdeno, al mismo tiempo esto se refleja en un incremento en la disponibilidad del aluminio y el manganeso hasta unos niveles tóxicos lo cual afecta fundamentalmente a los rizobios de rápido crecimiento (Toro, 1996). Generalmente, los rizobios más sensibles al pH nodulan más lentamente que aquellos que toleran mayor acidez.

Las cepas rizobianas más tolerantes a los bajos pH y altas concentraciones de aluminio, pueden ser seleccionadas para introducirlas como inoculante en otros suelos ácidos. Un ejemplo de la realización, con éxito, de esta práctica se hizo en suelos de Australia (Glenn y Dilworth, 1994; Howieson, 1995). Aunque, cuando se trata de pH del suelo, la simulación a las condiciones de campo parece ser químicamente fácil de realizar, cepas tanto de *R. meliloti* como de *R. trifolii* que crecieron bien a bajos pH en los ensayos de laboratorio no mostraron las mismas características de acido tolerancia en el campo (Howieson *et al.* 1988).

Basándonos en el hecho de que las bacterias más competitivas son las que mayoritariamente colonizan las raíces, el proceso de adsorción y de colonización de la raíz por parte de la bacteria, depende enormemente del pH del suelo. Así, en suelos con pHs por debajo de 6, el número de *R. meliloti* apenas alcanza las 10 células/gramo; si el pH se sitúa entre 7-8 el número de células puede alcanzar hasta 10^3 células por gramo de suelo (Amarger, 1980). *Bradyrhizobium* está ausente en suelos con pHs mayores de 6,5 y aparecen, sin embargo, aproximadamente 10^2 células por gramo de suelo con pHs entre 4,5 y 5,5. En general, las distintas especies rizobianas pueden alcanzar niveles de hasta 10^7 células por gramo de suelo dependiendo del pH de éste.

c.- Los niveles de Calcio

La concentración de este catión en el suelo juega un papel muy importante en la ecología de los rizobios. Como se detalla anteriormente, la presencia o ausencia de Ca^{2+} condiciona la relación simbiótica en algunos sistemas, facilitando o inhibiendo la adhesión de la bacteria a la planta. En *R. leguminosarum* bv. *viciae* se requiere el calcio para la síntesis de ricadhesina y el mantenimiento de la estabilidad de algunas proteínas de la membrana externa ligadas al peptidoglucano. Generalmente, la bacterias de *R. meliloti* ácido-tolerantes requieren un mayor nivel de calcio para su crecimiento que aquéllas que no lo son. En condiciones de pH bajo, el proceso de infección de los pelos radicales requiere una mayor cantidad de calcio en comparación con los niveles requeridos normalmente para el crecimiento de la leguminosa. Así, en estas mismas condiciones, se ha sugerido que un suplemento de calcio incrementa la inducción de los genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

(Beck & Munns, 1985; Howieson & Ewing, 1986; Rechcigl *et al.*, 1987; Richardson *et al.*, 1988; Graham, 1992; Glenn & Dilworth, 1994).

d.- La temperatura

La temperatura es un factor muy importante en la interacción simbiótica, afectando tanto a la planta como a la bacteria de tal manera que se ve afectado el intercambio de señales. De esta forma, se ha visto que las plantas de soja fijadoras de N₂ (mediante interacción con bacterias) ven limitado su crecimiento a temperaturas inferiores a 17°C de una manera muy notable, en comparación con las plantas que usan normalmente el nitrógeno combinado (Lindemann & Ham, 1979; Legros & Smith, 1994). Esta sensibilidad está influida por la naturaleza de las dos partes implicadas en la asociación. Así, la nodulación de *Trifolium subterraneum* cv. Woogenellup por *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 no se ve afectada cuando el ensayo se lleva a cabo, en el laboratorio, a temperaturas superiores a los 25°C pero si por debajo de los 22°C. Sin embargo, esta estirpe tiene capacidad de nodular otros cultivares a bajas temperaturas. En el campo, la cepa TA1 no nodula el cultivar Woogenellup (Gibson, 1968; Lewis-Henderson & Djordjevic, 1991 a y b).

Todos los estadios de la interacción simbiótica investigados hasta la fecha (curvatura de los pelos radicales, penetración de la bacteria y formación del canal de infección y el desarrollo y función del nódulo) han mostrado una inhibición a bajas temperaturas (Zhang & Smith, 1994). Gibson, en su revisión del año 1971 sobre los efectos medioambientales en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, sugiere que temperaturas rizosféricas subóptimas conducen más bien a un retraso en la infección

de los pelos radicales, que a un retraso en la iniciación del desarrollo nodular o la asimilación del nitrógeno.

Generalmente, temperaturas comprendidas entre 20 y 30°C se consideran como las adecuadas para el funcionamiento óptimo del metabolismo rizobiano y a su vez para el mantenimiento de una tasa constante de nitrógeno dentro del nódulo.

e.- La humedad y la salinidad

El grado de humedad del suelo afecta tanto a los microorganismos del suelo como a las plantas. Generalmente, los cambios en el balance hídrico del suelo no supone solamente cambios en la disponibilidad del agua, sino también supone grandes cambios en las concentraciones de algunos iones, y esto a su vez supone cambios en el pH del suelo. Así, las condiciones de sequía se acompañan habitualmente de estrés salino y esto afecta la supervivencia y la competitividad de los rizobios (Bottomley, 1992; Glenn & Dilworth, 1994; Bordelau & Prévost, 1994). Se ha comprobado, que poblaciones de *Bradyrhizobium* son más persistentes en suelos con déficits hídricos estacionales en comparación con las poblaciones de *Rhizobium*, presumiblemente porque las primeras mantienen un contenido hídrico más bajo que las últimas.

Aunque, generalmente, las leguminosas son más sensibles que los rizobios a las condiciones salinas, los elevados niveles de cloruro sódico alteran el metabolismo bacteriano causando un incremento en el contenido de glutamato intracelular. Posiblemente, la célula utiliza este sistema como defensa para mantener el balance iónico célula-medio. Esto tiene como consecuencia la alteración del mecanismo de fijación de nitrógeno y de la síntesis de glutamina.

f.- Uso de herbicidas y pesticidas

El tratamiento con este tipo de productos es una práctica comúnmente utilizada en la protección de los cultivos. Su uso, sin embargo, tiene muchas repercusiones tanto sobre el medioambiente como sobre las plantas. De hecho, se ha comprobado que los herbicidas afectan el crecimiento de la planta y por consiguiente influyen negativamente en la capacidad de nodulación de *Rhizobium*. Además se ha demostrado que semillas tratadas con bajas concentraciones de fungicidas conducen a una pobre nodulación. Koopman *et al.*, (1995) analizaron el efecto causado por el uso de un herbicida en el crecimiento de las plantas y el número de nódulos que es capaz de formar. Los resultados obtenidos por estos autores demuestran una disminución tanto en la capacidad de la alfalfa para rebrotar, y en el número de nódulos formados, debido probablemente a la muerte de los nódulos. Matensson y Nilson (1989), trabajando con el mismo tipo de producto llegaron a los mismos resultados. Ellos rexplicaron el bajo número de nódulos por una sensibilidad de las etapas más tempranas del proceso simbiótico a dicho herbicida.

g.- Factores biológicos

Además de todos los factores ambientales citados, existen diversos factores biológicos que intervienen en la competitividad de las cepas. Los componentes de la microflora del suelo, aparte de las poblaciones autóctonas de rizobios, afectan notablemente tanto la supervivencia y la colonización de la rizosfera por parte de las

estirpes inoculadas, como el poder competitivo de éstas. Así por ejemplo la presencia del parásito intracelular *Erwinia herbicola* puede suprimir la nodulación de los rizobios mediante producción de una toxina que bloquea los sitios de unión a los pelos radicales (Handelsman & Brill, 1985). También la presencia de bacteriofagos o bacteriocinas altera el tamaño de las poblaciones. El desarrollo de protozoos en la rizosfera, estimulado por la abundancia de carbono, afecta el número de rizobios de acuerdo con la relación predador/presa.

5.- Leguminosas y cepas bacterianas con su rango de huésped alterado

Una manera de superar la baja ocupancia de los nódulos por parte de la cepa inoculante en el campo sería la de seleccionar genotipos de plantas con una nodulación limitada por las cepas nativas pero al mismo tiempo que permiten la nodulación por la cepa inoculada. Han sido determinados varios genes de nodulación, específicos de genotipo o cultivar (GSN o CSN) que permiten a una bacteria nodular una determinada planta dentro de una misma especie de leguminosa. Mutaciones en estos loci, que no pueden ser complementadas por regiones análogas de otras especies de rizobios, causan un retraso o una menor efectividad de nodulación y pueden alterar el rango del hospedador. Entre estos genes figuran los *nodFEGH* en *R. meliloti* y *nodFE* en *R. leguminosarum* y *R. trifolii*. Algunos de estos genes como *nodFE*, *nodL* y *nodM* están presentes en todas las especies de *Rhizobium*, mientras *nodO* se encuentra solamente en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *nodH* y *nodPQ* en *R. meliloti*, *nodZ* en *B. japonicum* y *nodSU* en *B. japonicum* USDA110, *Rhizobium* NGR234, *Azorhizobium caulinodans* y en *Sinorhizobium fredii* USDA257.

Los genes que controlan la especificidad del hospedador pueden actuar tanto positiva como negativamente en cuanto al control de la nodulación se refiere. Así, el gen *nolA* de la cepa USDA110 de *B. japonicum* codifica para una proteína reguladora transcripcional de unión al ADN, homóloga a MerR (Sadowsky *et al.*, 1991). Cuando se transfiere *nolA* mediante conjugación a cepas del serogrupo 123, les confiere la capacidad de nodular plantas cuya nodulación le es normalmente restringida. Para explicar esto, se sugiere que la proteína NolA ejerce un efecto represivo sobre la expresión inducida por isoflavonas codificadas por los operones *nodD(1)* y *nodYABCSUIJ* (Dockendorff *et al.*, 1995).

Otro ejemplo de este tipo de genes se encontró en *S. fredii*, donde el gen cromosómico *nolC* afecta la especificidad de la cepa USDA257 (Heron *et al.*, 1989; Krishnan & Pueppke, 1991). Este gen tiene homología con el *dnaJ* de *E. coli* implicado en el proceso de choque térmico y es, aparentemente, capaz de modificar el nivel de producción de los exopolisacáridos (Krishnan & Peuppke, 1992) así como de modular los niveles de nodulinas en la planta. El gen *nolC* podría ser un gen regulador ya que es capaz de modificar la cantidad de EPS producido, así como de modular los niveles de nodulinas en la planta.

Se han aislado mutantes del serogrupo 123 pertenecientes a *B. japonicum* capaces de aumentar la restricción de nodulación, mediada por el genotipo PI 377578, hacia las plantas de soja que llevan el alelo *RJ4* (Judd *et al.*, 1993). Se han identificado otras plantas con un genotipo de tipo PI, como PI 417566, que restringen su nodulación con cepas de *B. japonicum* MN1-1c (USDA 430) a las del serogrupo 129 y a USDA 110; de esta manera han sido seleccionados tanto genotipos de plantas con nodulación restringida así como mutantes bacterianos capaces de superar esta barrera (Lohrke *et al.*, 1995). Uno de los ejemplos de genes que permiten a la bacteria superar la restricción de la nodulación es el gen *nolA* que permite a cepas del

serogrupo 123 de *B. japonicum* de superar la restricción condicionada por el genotipo PI 377578 (Sadowsky *et al.* , 1991).

Algunos análisis microscópicos indican que la restricción de la nodulación de soja con *B. japonicum* ocurre en el estado simbiótico tanto antes como después de la formación del primordio nodular (Sadowsky *et al.*, 1995). Estudios recientes sugieren que la restricción de la nodulación por *B. japonicum* esta determinada por el genotipo de las raíces, y es dependiente de la temperatura de crecimiento de la planta. Estos experimentos se realizaron en jarras Leonard usando tres variedades de soja de distintos genotipos (PI 377578, PI 417566 y el tercero conteniendo el alelo Rj4) inoculadas con tres cepas distintas de *B. japonicum* USDA438, USDA61 y USDA123. El ensayo se realizó a las temperaturas de 20, 25 y 30°C (Sadowsky *et al.*, 1995). Como resultado, se indica la capacidad de USDA438 y USDA61 de formar más nódulos a 30°C que a 20°C en PI 377578; la estirpe USDA123 se comportó de la misma manera formando más nódulos en este mismo cultivar a los 30°C que a los 20°C. EL tercer cultivo no parece estar afectado por los cambios térmicos del ensayo ya que las tres cepas de *B. japonicum* inducen la formación del mismo número de nódulos en todos los casos. Esto sugiere que el efecto de la temperatura en la nodulación no está relacionado con la cepa inoculante. El efecto de la temperatura sobre la especificidad de la interacción de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv.*viciae* con guisante fue sugerida desde el año 1984 por Lie.

Se han caracterizado cepas de *R. tropici* y de *R. etli* con una capacidad limitada para nodular y fijar N₂ con los genotipos G21117 y G10002 de *Phaseolus vulgaris*, pero que eran capaces de realizar una simbiosis efectiva con las biovariedades Jamapa y Amarillo Gigante de judías. Además, experimentos de competitividad demuestran que cepas cuya nodulación está restringida competían con éxito con cepas descritas como altamente eficientes, llegando a ocupar más del 40%

El proceso simbiótico parece depender de la interacción gen a gen; en este caso el gen *nodX* de TOM está controlado por el gen *sym-2* de la planta. Este último parece funcionar como receptor o mediador que lleva a su destino la información específica emitida por los factores nod. La cepa TOM presenta un perfil de lipooligosacáridos o factores nod distinto al de las demás cepas de *R. leguminosarum* (López-Lara *et al.*, 1993; Firmin *et al.*, 1993) lo que explicaría esta diferencia de comportamiento entre la cepa TOM y el resto de las bacterias ensayadas.

6.- Genes bacterianos implicados en la competitividad por la nodulación

La capacidad competitiva de algunas cepas rizobianas para formar nódulos puede verse afectada por múltiples factores que pueden alterar este proceso causando por ejemplo cambios en alguna característica fenotípica como motilidad o producción de polisacáridos. También mutaciones en alguno de los genes *nod*, *exo*, *lps*, *ndv* ó *nif* causan un descenso en el poder competitivo de las cepas, a pesar de mantenerse su capacidad de formar nódulos.

Además de estos genes existen otros que, aunque no se requieren para el establecimiento de la simbiosis, afectan la competitividad de las cepas. Algunos de ellos tienen funciones conocidas como las implicadas en la síntesis de rizopinas y bacteriocinas, o el metabolismo de prolina y derivados (Jimenez-Zurdo *et al.*, 1995). Sin embargo, existen otros genes que a pesar de conocerse su implicación en este proceso, sigue sin ser definidas sus funciones como es el caso de los genes *nfe*. Existe también, a parte de los compuestos excretados por parte de las bacterias, numerosos ejemplos de metabolitos excretados por la planta que ejercen una presión selectiva sobre el crecimiento de los microorganismos del suelo. Esto incluye productos como

la trigonelina (Bernard *et al.*, 1986, Boivin *et al.*, 1991) y las flavonas (Hartwig *et al.*, 1991) que son producidos por la planta y estimulan el crecimiento de múltiples rizobios, o bien la homoserina producida por guisante y que selecciona el medio de crecimiento para *R. leguminosarum* bv *viciae* (Van Egeraat, 1975). Los exudados vegetales pueden provenir tanto de plantas huésped de bacterias como de los restantes individuos de la flora, teniendo la misma función selectiva sobre gran variedad de rizobios (Hartwig *et al.*, 1991, Tepfer *et al.*, 1988a y b).

a.- Región *nfe* de *R. meliloti* GR4

R. meliloti GR4 se caracteriza por poseer, además de los dos plásmidos simbióticos o megaplásmidos donde se localizan los genes esenciales de la simbiosis, otros dos plásmidos de menor tamaño: pRmeGR4a de 114-megadaltons y pRmeGR4b de 140-megadaltons (Toro & Olivares, 1986). El pRmeGR4a es autotransmisible y aún no se le ha sido asignada ninguna característica fenotípica; sin embargo, al plásmido pRmeGR4b se le ha relacionado con la producción de melalina (Mercado-blanco & Olivares, 1993) así como la localización de regiones implicadas en la alta infectividad mostrada por RmGR4 (Toro & Olivares, 1986).

a. 1.- Identificación de la región *nfe*

Se ha observado que las cepas derivadas de GR4, curadas de los plásmidos críticos pRmeGR4a y pRmeGR4b son menos infectivas y presentan un nivel competitivo más bajo que el de la cepa salvaje GR4. Además, GRO13, otra derivada

de GR4 que ha perdido el pRmeGR4a, pero que todavía conserva el plásmido pRmeGR4b, resulta ser más infectiva y competitiva con respecto a otras cepas de *R. meliloti* ampliamente conocidas como: 2011, AK631, L5.30 y 104A14 (Sanjuan & Olivares, 1989); al mismo tiempo, la cepa GRO13 presentaba unos niveles de competitividad e infectividad mayores a los de una de las derivadas de GR4, denominada GRP4, que ha sido curada de los dos plásmidos no simbióticos. Esto apuntaba hacia la posibilidad de que el plásmido pRmeGR4b era el responsable de la mayor infectividad y competitividad mostradas por GRO13, no sólo respecto a las derivadas curadas de este plásmido, sino también respecto a otras cepas de *R. meliloti*.

Mediante construcción de un banco de genes del plásmido pRmeGR4b, se pudieron identificar dos regiones relacionadas con el mayor grado de infectividad mostrado por la cepa GR4 denominadas Inf1 e Inf2 (Toro & Olivares, 1986). La región Inf1 que se localiza en el plásmido recombinante pRmNT40, procedente del banco de genes, daba señales de hibridación con sondas que contenían promotores tipo *nif* (Toro & Olivares, 1986), lo que sugería la presencia de un promotor de este tipo en dicha región.

Mediante uso del transposón Tn3::HoHo1, se realizaron inserciones dentro del plásmido pRmNT40, lo que permitió la obtención de múltiples mutantes (Sanjuan & Olivares, 1989). Todas las inserciones localizadas en las proximidades de los posibles promotores *nif* presentaban un retraso en la nodulación y un descenso en la competitividad en comparación con la cepa parental. A esta región, por su implicación en la infectividad y competitividad en la nodulación se denomina *nfe* (nodules formation efficiency) (Sanjuan & Olivares, 1989).

a. 2.- Caracterización y estructura de los genes *nfe*

El análisis de la secuencia de nucleótidos de la región de ADN definida por mutagénesis con el transposón Tn3::HoHo1, le permitió a Soto *et al.* (1993) detectar la presencia de 10 fases de lectura abierta (posibles ORFs) elegidas, en principio, por su probabilidades altas de utilización de codon y por su tamaño próximo o superior a 100 aminoácidos. Los ORFs se hallan precedidos por sitios potenciales de unión al ribosoma (RBS), con homología a la secuencia consenso descrita para *E. coli* (Shine & Delgarno, 1974).

En la **figura 1** se representa la localización y extensión de los ORFs. El ORFB codifica una proteína de 232 aminoácidos. A 32 pb a la derecha del ORFB, se localiza otro ORF con polaridad contraria, al que se denominó *nfeA* y que puede codificar una proteína de 141 aminoácidos. A 211 pb del codon stop del *nfeA*, se identificó otro ORF que también se transcribe de izquierda a derecha. Este ORF, *nfeB*, codifica una proteína de 311 aminoácidos. A 128 pb de *nfeB*, se identificó el

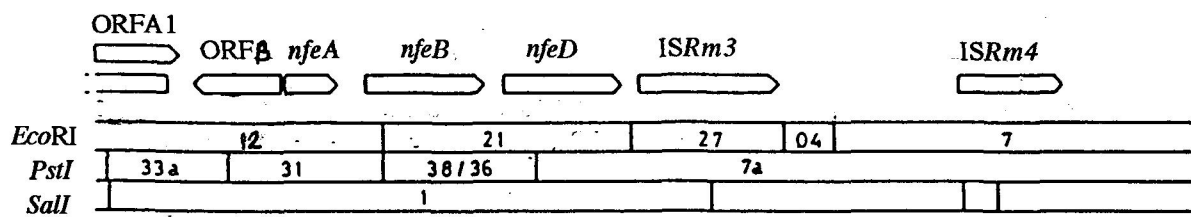


Fig.1 Organización de los genes *nfe* y de parte de la región adyacente (Soto-Tesis Doctoral, 1993; Mercado-Blanco & Toro, 1996).

ORFC que potencialmente codifica una proteína de 320 aminoácidos y que esta precedido por un posible promotor. Este ORF, al que se denominó posteriormente *nfeD*, se transcribe en la misma dirección que los otros genes *nfe*. Dos de los genes *nfe*, *nfeA* y *nfeB*, llevan promotores con una homología altamente conservada a la secuencia consensus para σ^{54} (Soto *et al.* 1993), así como secuencias de reconocimiento características de la proteína NifA. Por otra parte, la proteína codificada por *nfeD* muestra homología a la ornitina ciclodeaminasa (OCD) de *A. tumefaciens* (Soto *et al.*, 1994). La presencia de este tipo de genes ha sido descrita recientemente en *B. japonicum*, aunque en este caso el gen detectado y denominado *nfeC* tiene una localización cromosómica (Chun & Stacey, 1994). Todavía no se ha definido con precisión la función de los genes *nfe*, sólo por la homología que tiene el NfeD (26%) con la ornitina ciclodeaminasa (OCD) (Soto *et al.*, 1994) de *A. tumefaciens*, se sospecha la implicación de estos genes en el metabolismo secundario, ya que la enzima OCD es la responsable de la conversión directa de ornitina a prolina con liberación de amonio. Es posible que los genes *nfe* permitan a la bacteria un uso selectivo de determinadas fuentes de carbono disponibles durante el proceso de infección y que podrían ocasionar una mayor ocupación de nódulos.

b.- Metabolismo de la prolina

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la principal fuente de carbono para los bacteroides es el ácido C4-dicarboxilato exportado desde las células de la planta (Finan *et al.*, 1983; Day & Copeland, 1991). Sin embargo, esta fuente de energía no se ha establecido como la única o la más eficiente bajo las distintas condiciones. El catabolismo de prolina en procariotas se hace generalmente via pirrolin-5-carboxilato

la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas se refiere, las rizopinas corresponden a compuestos sintetizados dentro del nódulo por los bacteroides y posteriormente usados por cepas rizobianas en vida libre, presentes en el canal de infección o en la rizosfera pero también por otras cepas, confiriéndoles a aquellas una ventaja metabólica (Murphy & Saint, 1992). Las rizopinas difieren de los metabolitos secundarios de la planta por ser producidos por los bacteroides localizados dentro de los nódulos. Las rizopinas entran dentro del concepto de opinás descrito en *Agrobacterium* (Guyon *et al.*, 1980) donde las bacterias patógenas inducen la producción de un sustrato selectivo para el crecimiento de otras bacterias capaces de metabolizarlo (Schell *et al.*, 1979).

Dos rizopinas han sido descritas hasta el momento: L-3-O-metil-scylo-inosamina (3-O-MSI) (Murphy *et al.*, 1987, Tempé & Ptit, 1983), y scylo-inosamina (SI ó sIa) (Saint *et al.*, 1993), ambas pertenecen a la clase de los inositoles. Con el fin de determinar la frecuencia de cepas rizobianas capaces de metabolizar rizopinas, se hizo un estudio sistemático incluyendo cepas de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii* y *phaseoli*, además de otras cepas. La producción de rizopinas en estas cepas se evaluó en un 10% de cepas de *R. meliloti* y un 14% de las de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, pero ninguna cepa de las demás biovariedades era capaz de metabolizar el 3-O-MSI (Wexler *et al.*, 1995). Todas las cepas capaces de catabolizar las rizopinas son capaces al mismo tiempo de sintetizar este compuesto, sugiriendo que los genes responsables de estos procesos han evolucionado conjuntamente (Wexler *et al.*, 1994). Los genes *mos*, para la síntesis de rizopinas y *moc*, para su catabolismo se localizan en el plásmido simbiótico que lleva al mismo tiempo los genes *nod* y *nif* (Murphy *et al.*, 1987, Saint *et al.*, 1993). Los genes *mos* están regulados por el sistema NifA/NtrA. La localización plasmídica de estos genes sugiere la posibilidad de una transferencia genética, lo que a su vez explicaría la

presencia de estos genes en los distintos grupos rizobianos. Se ha sugerido que el papel de las rizopinas consiste en proporcionar un sustrato selectivo para el crecimiento de determinados rizobios en la rizosfera y el canal de infección. De la misma manera, las rizopinas tienen un efecto directo en el proceso de la nodulación impidiendo la infección por aquellas cepas incapaces de metabolizarla. Mediante uso del transposón Tn5 se obtuvo una cepa mutada en el locus *moc* y por lo tanto era incapaz de catabolizar rizopinas. Experimentos de competitividad entre cepas salvajes y derivadas mutadas, realizados tanto en tubos de ensayo como en suelo, demuestran la ocupación de entre 95 y 85% de los nódulos por parte de la cepa salvaje en agar y en suelo, respectivamente (Murphy *et al.*, 1995). Aunque el mecanismo que permite esta dominancia no se ha aclarado, el concepto de las rizopinas ofrece posibilidades en la manipulación genética de cepas permitiendo el aumento de competitividad o incluso la persistencia de cepas beneficiosas en el suelo por transferencia de los genes de las rizopinas a estas bacterias o por selección de las cepas productoras de interés.

d.- Producción de Bacteriocinas

Algunas cepas rizobianas tienen la capacidad de producir antibióticos que inhiben el crecimiento de algunas otras. Se piensa que las bacterias capaces de dicha producción adquieren una ventaja selectiva a la hora de ocupar nódulos, lo que sugiere un papel importante en competitividad. De la cepa T24 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, se caracterizó una bacteriocina denominada trifolitoxina (Schwinghamer & Belkengren, 1968; Triplet & Barta, 1987; Triplet *et al.*, 1988 y 1994; Triplet, 1990; Breil *et al.*, 1993). Este pequeño péptido le permitía a la cepa T24, a pesar de ser Fix⁻, tener altos niveles de competitividad cuando se coinoculaba con cepas sensibles a la

trifolitoxina (Schwinghamer & Belkengren, 1968). Mediante mutagénesis dirigida con el transposón Tn5 del locus responsable de la biosíntesis de la trifolitoxina en T24, esta cepa perdió su ventaja en la competitividad por la nodulación cuando se coinoculaba con una cepa sensible (Triplett & Barta, 1987). Los genes *tfx* que codifican para la producción y resistencia a la trifolitoxina, fueron aislados, secuenciados y clonados de forma estable en el genoma de una cepa sensible: TA1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Triplett, 1990, Breil *et al.*, 1993). Como era de esperar, la cepa resultante era productora de la trifolitoxina y altamente competitiva a la vez que eficiente. Recientemente se ha comprobado que distintos grupos de proteobacterias son sensibles a la trifolitoxina (Triplett, 1994). Al igual de lo que ocurre con las rizopinas, está en estudio la posible utilización de la trifolitoxina para aumentar la competitividad de los inóculos en liberaciones de campo.

7.- Caracteres fenotípicos de la bacteria que se relacionan con el proceso competitivo

a.- Motilidad y velocidad de nodulación

Los rizobios son bacterias móviles gracias a la presencia de flagelos de distinto tipo como por ejemplo las de tipo polar o subpolar encontradas en las especies pertenecientes al género *Bradyrhizobium* y las de tipo peritrico presentes en las estirpes de *Rhizobium* (De Ley & Rassel, 1965; Jordan, 1984). Esta capacidad de movimiento juega un papel importante en la supervivencia de las bacterias condicionando su poder de desplazamiento hacia las sustancias atrayentes (azúcares) o bien alejándose de las nocivas (antibióticos y bacteriocinas).

Un estudio sobre la implicación de la motilidad rizobiana en la formación de nódulos, realizado en condiciones de laboratorio con cepas de *Rhizobium* y de *Bradyrhizobium*, demuestra la formación del mismo número de nódulos por parte de la bacteria no mótil en comparación con la cepa parental (Napoli & Albersheim, 1980; Ames & Bergam, 1981; Mellor *et al.*, 1987; Malek, 1992). Sin embargo, algunos experimentos de competitividad donde se enfrentaban cepas salvajes y sus derivadas no mótilas demuestran el papel de la motilidad en el poder competitivo de las bacterias ya que las cepas mutadas formaron menos nódulos en las condiciones del ensayo (Ames & Bergman, 1981; Mellor *et al.*, 1987; Malek, 1992). Ensayos de campo, llevados a cabo por Liu *et al.* (1989) concluyeron en resultados similares a los mencionados anteriormente, aunque hay que añadir que en estas condiciones la textura del suelo juega un papel importante en la motilidad de las bacterias.

Por otra parte, y desde el año 1984, existen pruebas de la correlación que existe entre la velocidad de la nodulación y la competitividad en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *phaseoli*. (Handelsman *et al.*, 1984). La explicación que se le dá a este fenómeno es que las cepas que consigan nodular más rápidamente serán más competitivas, ya que nodulan antes de que se dispare el mecanismo de autorregulación de la planta. (Dowling & Broughton, 1986; Sargent *et al.*, 1987; Hahn & Hennecke, 1988; Graham & McDermott, 1989).

b.- Biosíntesis de los polisacáridos de la superficie celular

Los polisacáridos excretados por parte de las cepas rizobianas cumplen un papel fundamental en la supervivencia de estas bacterias tanto en su estado de vida libre como en la simbiótica. En vida libre, los exopolisacaridos (EPS) excretados por

la bacteria tienen una función protectora contra el estrés, acumuladora de nutrientes y facilitan la unión de la bacteria a los pelos radicales; mientras que durante la simbiosis, los EPS están requeridos para el éxito de la invasión de la raíz y el desarrollo del nódulo (Leigh & Walker, 1994).

Los lipopolisacáridos (LPSs) son los componentes mayoritarios de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, incluyendo la especie *Rhizobium*. Los cambios en estructura de los LPSs fue relacionada con la adaptación a algunos cambios climáticos como el pH, la concentración de oxígeno y los cambios de la presión osmótica (Tao *et al.*, 1992; Zahran *et al.*, 1994).

Los primeros estudios sistemáticos sobre la genética de los LPSs se desarrollaron a partir del descubrimiento de una serie de mutantes Ndv⁻ (afectado en el desarrollo del nódulo) de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN42, obtenidos por mutagénesis al azar, afectados en la región polisacáridica del LPS (Noel *et al.*, 1986). También se han descrito algunos de los mutantes de *R. meliloti* que aunque deficientes en la síntesis de LPS, son capaces de establecer una simbiosis efectiva con las plantas de alfalfa (Lagares *et al.*, 1992). Sin embargo, mutantes tanto de *R. meliloti* como de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *viciae* que producen lipopolisacáridos con la longitud del antígeno O fuertemente reducida o bien ausente del todo conducen a un desarrollo anormal de los nódulos, indicando que este es un requerimiento adicional para el proceso de nodulación (Noel, 1992; Kannenberg & Brewin, 1994). En el caso de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, estos mutantes defectuosos en la síntesis de la cadena del antígeno O dan lugar a nódulos abortivos en las etapas más tempranas de la nodulación (Noel *et al.*, 1986).

Además, los estudios sobre mutantes deficientes en la síntesis de polisacáridos revelan la necesidad de la presencia de una amplia variedad de polisacáridos de superficie celular para el establecimiento de una simbiosis efectiva entre *Rhizobium* y



las leguminosas (Brink *et al.*, 1990; Carlson *et al.*, 1992; Noel, 1992). Defectos en los genes *exo*, necesarios para la producción del exopolisacarido ácido de las cepas de *R. meliloti* y de *R. leguminosarum*, conllevan a la formación de pseudonódulos inefectivos en plantas que desarrollan normalmente nódulos indeterminados (Carlson *et al.*, 1987; Djodjevic *et al.*, 1987; Leigh & Lee, 1988; Glazebrook & Walker, 1980). Los mutantes aislados de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* y que tenían un fenotipo no mucoide, mostraron un nivel competitivo más bajo que el de la cepa salvaje. Lo mismo ocurrió con otros mutantes deficientes en exopolisacáridos de *R. tropici* y *B. japonicum* (Bhagwat *et al.*, 1991). Sin embargo, un ejemplo opuesto a estos resultados fué encontrado por Zdor y Pueppke en el año 1989 al aislar un mutante de *S. fredii* que producía menor cantidad de EPS y que era más competitivo para la nodulación del cultivar Peking. Hay cepas de *B. japonicum* productoras de polisacáridos en grandes cantidades (NPS) que parecen conferirles una alta competitividad en condiciones de campo, presumiblemente por la facilidad de adhesión a los pelos radicales (Streeter *et al.*, 1992). La desventaja que presentan los mutantes EPS⁻ de *R. meliloti* de ser al mismo tiempo Inf⁻ hace imposible la realización en ellos de estudios de competitividad.

Secuencias de inserción en *Rhizobium*

1. Introducción

Las secuencias de inserción fueron descubiertas en las bacterias como inserciones de secuencias de ADN que se producían de forma espontánea. Estos elementos se describen como constituyentes naturales de cromosomas bacterianos, plásmidos y bacteriófagos; de hecho, podría decirse que son elementos constitutivos normales de la bacteria. En el caso de las bacterias gram-negativas, la mayoría de los ISs se han identificado en bacterias entéricas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*. Existen múltiples pruebas de la actividad de estos elementos porque además de inserciones, son capaces de provocar inversiones, deleciones y fusiones de replicones que conducen a la activación y expresión de genes crípticos (Berg & Howe, 1989). Los primeros elementos IS descritos en procariotas se identificaron como agentes causantes de mutaciones espontáneas en *E. coli* (Jordan *et al.*, 1968; Shapiro, 1969). Los elementos de inserción o transposones simples (IS), se distinguen de los transposones compuestos (Tn) por llevar, estos últimos, información genética adicional a la de la transposición; generalmente esta información consiste en una resistencia a drogas (Campbell *et al.*, 1977).

2.- Sistemas de identificación de las secuencias de inserción en *Rhizobium*

El descubrimiento de la presencia de las primeras secuencias de inserción dentro de la familia *Rhizobiaceae* ocurrió, a parte por secuenciación en algunos casos, básicamente gracias a la actividad de movimiento que tienen estos elementos y debido a su carácter mutagénico al insertarse dentro de algún gen esencial para la supervivencia o el desarrollo de la bacteria, precisamente de esta misma manera fueron descubiertos los elementos de inserción en *E. coli*. Así por ejemplo se

para la enzima β -glucuronidasa. En presencia del sustrato X-gluc (derivado del ácido glucurónico) la bacteria portadora del gen metaboliza el ácido, haciendo precipitar el sustrato que da una coloración azul a la colonia. La interrupción del gen o de su promotor permite la selección positiva de las colonias de color blanco. Todos estos genes (a excepción del *gusA*) fueron clonados individualmente dentro del vector de amplio rango de hospedador pSUP104 por su estabilidad en un gran número de especies bacterianas gram-negativas (Simon *et al.*, 1991).

3.- Características de las secuencias de inserción

Los elementos IS sólo llevan información para su propia transposición: un gen que codifica para la transposasa. Las demás enzimas implicadas en el proceso son aportadas por la propia célula bacteriana. A la hora de insertarse en nuevas zonas genéticas, la secuencia de inserción puede adoptar una de las dos maneras de transposición: la transposición conservativa o la transposición replicativa. En el primer caso el transposón pasa de la sede donadora a la sede receptora, perdiendo la primera la presencia del transposón. En el segundo caso la sede receptora recibe el transposón que resulta ser una copia del que estaba, y por tanto se mantiene en la sede donadora. A la hora de transponerse, no parece haber relación alguna que une las secuencias donadora y receptora del transposón. Sin embargo, la distribución de dianas receptoras no se produce al azar, de manera que puede haber elementos IS que tienen tendencia a insertarse en zonas determinadas del cromosoma bacteriano (zonas calientes o hotspots), mientras que otras muestran una preferencia a ciertas regiones del cromosoma (Lewin, 1987). La frecuencia de transposición, aunque variable, oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} por elemento y por generación.

Una característica adicional y comúnmente presente en los elementos IS es su reducido tamaño que suele ser inferior a 2500 pares de bases, terminando en ambos extremos con repeticiones terminales generalmente cortas (Inverted Repeats) muy parecidas entre ellas aunque casi nunca idénticas. El tamaño de las IR que flanquean los elementos IS en *Rhizobium* es variable, siendo de 22 hasta 41-42 pb para *IS_{Rm2}* e *IS_{RI}* respectivamente. Un determinado elemento móvil presenta siempre las mismas IR que serán reconocidas por la transposasa. Cuando se produce la transposición, el transposon aparece flanqueado en ambos lados por la repetición directa de la secuencia (Directed Repeats) normalmente de 5 a 9 pb (Ilida *et al.*, 1983; Lewin, 1990) aunque existen excepciones como la del elemento *IS_{Rm2011-2}* que genera la duplicación sólo de un dinucleótido a la hora de transponerse (Selbitschka *et al.*, 1995).

4.- Bases para la clasificación de las secuencias de inserción

La clasificación de los ISs en distintos grupos se hacía anteriormente básicamente por la homología que podría existir entre las distintas secuencias de inserción, y se afiliaban en el mismo grupo sólo aquellos elementos que presentaban un alto grado de similitud entre ellos y cuyos huéspedes se relacionaban, como es el caso por ejemplo de la clase *IS_I* que engloba las ISs aisladas de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Umeda & Ohtsubo, 1991), mientras que el resto de secuencias de inserción que no cumplían estos criterios se agrupaban en una clase heterogénea (Galas & Chandler, 1989). Sin embargo, el incremento rápido en el número de secuencias de inserción identificadas en los últimos años, mostró la pobreza de ésta base de clasificación y la necesidad de tener en cuenta

características más específicas para una clasificación más precisa. Por consiguiente, la clasificación actual de las secuencias de inserción en distintas familias o clases se basa en la conservación de los dominios de la transposasa y en el número de ORFs que la constituyen, así como en las similitudes entre los IRs y el tamaño de las repeticiones directas (Flavell *et al.*, 1994). Estos criterios dieron lugar, además de una gran variedad de familias, a dos de los grupos más amplios que se han descrito hasta el momento, la familia IS4 que engloba más de 40 elementos móviles (Rezsöhazi, *et al.*, 1993), y la familia IS3 que incluye más de 30 secuencias de inserción tanto de bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Rubens *et al.*, 1989, Fayet *et al.*, 1990).

a.- La familia IS3.

Una de las características más relevante presentada por los miembros pertenecientes a la familia IS3 es la presencia de dos ORFs cuya unión genera una transposasa activa (Prère *et al.*, 1990). De hecho, estos elementos presentan generalmente la misma organización: un ORF pequeño (que se denomina frecuentemente ORFA) seguido por otro más grande (ORFB) que está en la fase -1 con respecto al primero. Justo en la parte carboxi-terminal del ORFA se nota la presencia de una secuencia que determina un sitio potencial de cambio en la fase de lectura (frameshifting window). Dicha secuencia provocaría un deslizamiento de los ribosomas a la hora de la transcripción del ORFA y un cambio en la pauta de lectura de su extremo 3', de manera que el producto que este último genera se pone en fase con la pauta de lectura del ORFB lo que permite la fusión de los dos ORFs (A y B) en uno sólo, el ORFAB, cuya traducción sería la transposasa activa del elemento. Inmediatamente después de este

motivo de unión se localiza generalmente una estructura en tallo y lazo que se sospecha esta implicada en el aumento de la eficiencia de fusión de los dos ORFs (Jacks *et al.*, 1988).

Se piensa que el "frameshifting" conduce a un mayor aprovechamiento de la información genética ya que permite la especificación de múltiples proteínas de distintas funciones haciendo uso de un mínimo de material genético (Chandler & Fayet, 1993). La presencia de este motivo fue anteriormente observada en los retrotransposones y los retrovirus, donde la presencia de un "frameshifting" permitía la producción de la integrasa como resultado de la fusión del gen *pol*, que lleva las funciones de la integración del retrovirus, con el producto del gen *gag* situado en su región anterior (Jacks *et al.*, 1988). Estudios recientes sobre la funcionalidad de este motivo en los elementos de inserción demostraron su actividad *in vivo* en las secuencias IS150 (Vögele *et al.*, 1991) e IS911 (Polard *et al.*, 1991); detectada en ambos casos por la presencia de la proteína que resulta de la unión del ORFA con el ORFB. También en la secuencia de inserción IS1 (Sekine & Ohtsubo, 1989; Lüthi *et al.*, 1990) se determinó la presencia de la proteína InsAB, producto de la fusión entre los dos ORFs A y B (Zerbibe *et al.*, 1987; Escoubas *et al.*, 1991).

Por otro lado, los miembros de este grupo muestran una limitada homología a nivel de ADN, sobre todo en la región codificada por el ORFA que no presenta homología alguna entre las IS de esta familia. Sin embargo, la proteína codificada por el ORFB contiene dominios que se conservan en todos los miembros de la familia IS3 (Fayet *et al.*, 1990), lo cual hace que la similitud entre los distintos elementos de inserción de esta familia sea más conservada en la región codificada por el ORFB. Además, la mayoría de los dominios conservados en la transposasa están presentes también en las integrasas de los retrotransposones y los retrovirus (Fayet *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 1991), lo cual sugiere que ambas enzimas, transposasa o integrasa, siguen

proteína, respectivamente. El patrón de homologías que resulta de la comparación de las secuencias de estos dominios en los distintos elementos, así como su relativa localización a lo largo de la transposasa permitió definir dos grupos dentro de esta familia y que se denominaron IS4 e IS5 (Rezsöhazi *et al.*, 1993). Dicha clasificación se ve confirmada al mismo tiempo con la conservación de la secuencia de los IRs en cada grupo.

Es importante apuntar que las secuencias que constituyen los dominios C1 y N3 corresponden también a los mismos dominios llevados por las transposasas de los elementos que constituyen la familia IS3; lo que es indicativo de la relación existente entre el modo de transposición de los miembros de ambas familias. Además las secuencias de tipo IS4 comparten también algunos dominios de la integrasa con la familia IS15. Las transposasas del grupo IS4 se caracterizan por una separación de 110 aminoácidos entre los dominios N3 y C1 y donde C1 está situado, por lo menos, a unos 20 aa del extremo C-terminal (a excepción de la secuencia IS1096/1), mientras que las del grupo IS5 presentan una localización de los dominios N3 y C1 adyacentes uno al otro y con el C1 unido al extremo final de la proteína (Rezsöhazi *et al.*, 1993). Entre las secuencias de inserción aisladas de cepas del género *Rhizobium* que pertenecen a un grupo u otro se pueden citar: ISRIF7-2 aislada de la cepa F7 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Simon *et al.*, 1991) que lleva las características del grupo IS5; a este mismo grupo pertenece también el elemento ISR12 aislado recientemente de la cepa MSDJ4184 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y que parece estar ampliamente distribuido entre las cepas de *Rhizobium* aisladas de diferentes localizaciones geográficas, sin embargo no se han encontrado homólogos a este elemento en el género *Bradyrhizobium* (Mazurier *et al.*, 1996). En *R. meliloti*, no se han identificado hasta el momento más que dos secuencias de inserción pertenecientes a la familia IS4. Ambas secuencias, ISRm4 (Soto

et al., 1992b) e *ISRm4S* (este trabajo) fueron encontradas dentro del plásmido pRmeGR4b de RmGR4.

5.- Control de la actividad de transposición.

Las secuencias de inserción son ampliamente distribuidas y su número puede llegar a ocupar una considerable proporción del genoma bacteriano (Nyman *et al.*, 1981). Sus propiedades y abundancia implican una íntima relación y un estrecho control por parte del genoma hospedador para una perfecta coordinación de sus actividades con el crecimiento de la bacteria (Chandler & Fayet, 1993). Este control es ejercido a varios niveles: un primer nivel actúa sobre los promotores endógenos de la secuencia de inserción; dichos promotores, generalmente débiles, se localizan en los extremos del elemento dentro de alguna de las repeticiones terminales invertidas (IRs). Puesto que la activación del mecanismo de transposición exige un reconocimiento de estas IRs por parte de la transposasa específica del elemento, la expresión puede ser autoregulada a nivel transcripcional por unión de la propia transposasa (Chandler & Fayet, 1993). Un segundo nivel de control es mediante sistema de regulación de la traducción del transcrito en posible transposasa, que resulta particularmente importante para proteger algunos elementos de una activación "accidental" tras insertarse dentro de unidades activas del genoma. La transcripción de estos elementos a partir de promotores externos, observado por ejemplo en los elementos *IS10* e *IS50*, genera un ARNm capaz de adoptar una estructura secundaria en tallo y lazo que secuestra los sitios de inicio de la traducción y conduciendo de esta manera a la imposibilidad de su realización (Davis *et al.*, 1985; Krebs & Rznikoff, 1986).

de difícil y ambigua interpretación. Por estas razones las técnicas basadas en las características genotípicas de la bacteria son más fiables y precisas que aquellas que utilizan los determinantes fenotípicos, entre las primeras se indica el estudio del perfil plasmídico, del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), el análisis del ARNr o bien se requiere también la utilización de sondas con genes específicos como el gen *nifA*, *nifKDH* y *nodABC* para este tipo de estudios (Casse *et al.*, 1979; Stacey, 1985; Johnson, 1986).

Desde el año 1988, Wheatcroft & Watson (y posteriormente Simon y colaboradores en 1991) propusieron el uso de los elementos de inserción para identificar las cepas bacterianas a partir del perfil de hibridación de su ADN total digerido, con la sonda de un determinado elemento. De hecho, los mismos autores utilizaron la secuencia de inserción *ISRm1* para clasificar diferentes cepas de *R. meliloti*, aisladas del campo. Además, Kosier y colaboradores (1993) utilizaron la sonda del elemento *ISRm2011-2* para clasificar 78 cepas de *R. meliloti* aisladas del campo, pudiendo distinguir de esta manera 42 grupos diferentes; sin embargo, la clasificación de estas mismas cepas con el método tradicional que consiste en el estudio de su perfil plasmídico así como del IAR, llevó a la determinación de sólo 18 grupos distintos. Esta comparación de los resultados obtenidos con ambas técnicas sugiere la sensibilidad y fiabilidad de la técnica basada en el uso de secuencias de inserción para la clasificación de las cepas, a este método se le dio el nombre de "IS fingerprint".

Cuando se trata de distinguir muchas estirpes bacterianas entre ellas usando más de una secuencia de inserción, el "IS fingerprint" puede resultar laborioso, con lo que es posible en una primera etapa de selección usar la técnica de "IS handprint" (Kosier *et al.*, 1993) que consiste también en el uso de secuencias de inserción, pero se diferencia de la primera en informar únicamente sobre la presencia o la ausencia de

cada elemento, ya que se usa ADN total no digerido, directamente transferido en un filtro en forma de gotas que se exponen a la sonda en cuestión.

b.- Evolución de los genomas

Las mutaciones espontáneas, la selección natural y el aislamiento de los nuevos genomas se consideran elementos clave en la evolución biológica. Además, entre todos los sucesos y fenómenos naturales, aquellos que conllevan a las reordenaciones genéticas como las transposiciones, las deleciones o las recombinaciones se consideran de mayor importancia en la evolución (Selbitshka, 1991). Los elementos de inserción tienen la capacidad de insertarse en distintas partes del genoma bacteriano y aunque la frecuencia de estas transposiciones es generalmente baja, los cambios en la localización de estas secuencias conllevan no sólo a una nueva organización en las regiones donde se insertan por interrupción o activación de los genes adyacentes, sino también a reordenaciones genéticas más importantes como inversiones de ADN, deleciones, duplicaciones parciales y fusión de replicones; todo ello representa una importante contribución en la plasticidad génica y la mutagénesis espontánea en los genomas. Por esta razón, los elementos móviles juegan un papel importante en el proceso evolutivo de las distintas cepas (McClintock, 1984) aunque por su baja frecuencia sólo pocos reordenamientos causados por transposiciones pueden implicar un progreso en el proceso evolutivo. Las alteraciones causadas por la transposición de los elementos de inserción son múltiples y variadas como es el ejemplo de *IS_{Rm3}* identificado como un inactivador natural del gen *nodG* (Ogawa *et al.*, 1991); y aunque abundan más los ejemplos de

inserciones ocurridas en genomas procariontes, también existen pruebas de la actividad de estos elementos en cromosomas eucariontes (Britten, 1996).

7.- Secuencias intrónicas

Otro tipo de elementos móviles corresponde a las secuencias intrónicas, identificadas dentro del genoma de archaeobacterias; este descubrimiento debilitó la teoría común que consideraba a los intrones, junto con la membrana nuclear, como constituyentes específicos de los organismos eucarióticos. Esta teoría quedó definitivamente descartada gracias al descubrimiento, en el tRNA de las bacterias púrpura, de intrones del grupo I capaces de realizar el mecanismo de auto-"splicing" (Chu *et al.*, 1984), seguido por el descubrimiento de intrones de los grupos I (Kuhnel *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990; Reinhold-Hurek & Shub, 1992) y II (Ferat & Michel, 1993) en otras células bacterianas, e incluso fueron descritas secuencias de este tipo en plásmidos (Magrelli *et al.*, 1994). Además de los intrones del grupo I y del grupo II, capaces de transponerse a nivel de ARN, existen los llamados inteínas que realizan el mecanismo de "splicing" a nivel de proteína en eucariontes (Kane *et al.*, 1990), archaeobacterias (Perler *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1993) y bacterias (Davis *et al.*, 1992; 1994).

a.- Movilidad de los intrones

Los intrones son capaces de moverse para asegurar su dispersión dentro del genoma mediante dos mecanismos básicos: Un proceso por el que el intrón se inserta

Esta nueva teoría de la evolución se basa en el fenómeno de la reordenación de exones para explicar la generación de las construcciones proteicas existentes actualmente en los procariontes. Los intrones se consideran como fuente de reordenaciones genéticas que permiten la unión de los distintos dominios contenidos en varios exones para formar una determinada proteína, y que permite por ello la construcción de diferentes proteínas haciendo uso de varias combinaciones de estos dominios. Esta idea está apoyada por el hecho de que los exones actuales codifican para dominios específicos y funcionalmente distintos de una misma proteína. Los procariontes han evolucionado entonces, en el sentido de obtener construcciones enzimáticas más eficientes cada vez, dejando en detrimento la adquisición de nuevas actividades enzimáticas y por lo tanto sus genomas han perdido los genes con intrones. Esta pérdida a su vez es ventajosa porque reduciendo el tamaño del cromosoma, la bacteria logra aumentar la velocidad de replicación de su ADN (Rawn, 1989).

Considerando a los intrones como fuente de reordenaciones que se consideran ventajosas para la evolución de los distintos genomas, debería esperarse entonces que existiera una elevada proporción de genes con intrones en aquellos organismos que se encuentran en la actualidad evolucionando rápidamente con el fin de ocupar nuevos nichos ecológicos, como es el caso de las plantas fanerógamas, los insectos y los mamíferos (Rawn, 1989). Mientras que las bacterias que se han venido especializando a lo largo de los últimos miles de millones de años, apenas habrían tenido necesidad de adquirir nuevas combinaciones de dominios de las proteínas.

Como se sabe, la continuidad de la existencia de cualquier organismo significa obligatoriamente la necesidad en seguir evolucionando, lo que requiere a su vez cierta plasticidad del genoma y la posibilidad de adquirir nuevos genes para responder a las

nuevas exigencias de la evolución y a su presión selectiva. Entonces, si las bacterias han especializado sus funciones librandose de los intrones, a pesar de la ventaja que suponían para el genoma ¿cual es la manera mediante la cual logran seguir reordenando sus genomas para mantener su existencia y seguir la evolución?

La respuesta a esta pregunta viene dada por las secuencias de inserción que abundan en los genomas procarióticos y del mecanismo de conjugación. Los elementos móviles, como se ha mencionado en el apartado anterior, a pesar de ser considerados egoistas e incluso parásitos para la bacteria, permiten una movilidad y unas reordenaciones genéticas que a veces resultan ventajosas para el genoma donde residen. A su vez el mecanismo de conjugación de las bacterias proporciona un flujo de material genético adicional para la bacteria receptora ya que pueden ser transferidas cantidades importantes de DNA que puede ser tanto de origen plasmídico como cromosómico. Ello resulta muy importante en la adquisición de material genético valioso para perpetuarse, sobre todo en individuos sin capacidad para reproducirse sexualmente y obtener la heterogeneidad génica que este proceso proporciona.

Objetivo del trabajo

En las bacterias del género *Rhizobium* existe una proporción muy considerable de material genético extracromosómico de funciones desconocidas. Dos tipos de plásmidos se han definido en estas bacterias: pSyms, aquellos que son portadores de genes para el establecimiento de la simbiosis y los no-pSym o crípticos que pueden llevar genes que aunque no esenciales podrían modular el proceso simbiótico. Tanto pSyms como no-pSyms contienen en cualquier caso un amplio material genético cuya estructura y función está por determinar. *R. meliloti* GR4, es una cepa con una alta capacidad infectiva y competitiva. Distintos estudios han indicado que al menos parte de estos fenotipos están ligados a uno de sus plásmidos crípticos: el pRmeGR4b y en concreto a una región del mismo conocida como *nfe*. Aunque mutaciones en esta región llevan a un fenotipo menos competitivo e infectivo que la cepa parental, aun está por determinar si estos genes por sí solos son capaces de mejorar estas características simbióticas en otros fondos genéticos. De otro lado, la estabilidad observada en los plásmidos crípticos de *Rhizobium*, lleva a pensar a que estos serían importantes para la supervivencia y evolución de estas bacterias. Cuales son los componentes genéticos de los plásmidos crípticos?. En este estudio hemos querido contribuir a un mayor conocimiento sobre las cuestiones anteriormente indicadas, para ello se ha llevado a cabo la caracterización molecular de una región de ADN de 15,737 nucleótidos del plásmido pRmeGR4b adyacente a la región *nfe*. Al mismo tiempo se ha analizado la implicación de esta región junto a los genes *nfe* en infectividad y competitividad.

Material y Métodos

TABLA 1. Bacterias empleadas en este trabajo

Bacteria	Características relevantes	Fuente Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	<i>thi, pro, recA, hsdR, hsdM, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7, T_p^F, Sm^F</i>	Simon <i>et al.</i> , (1983)
HB101	<i>pro, leu, thi, lacY, endA, recA, hsdR, hsdM, Sm^F</i>	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)
DH5 α	<i>recA1, endA1, ϕ80d, lacZ, dm15</i>	Bethesda Research Laboratory
CGSC4548	<i>dapA16, thi-1, relA1, l⁻, spoT1</i>	Bukhari & Taylor (1971)
CGSC4549	<i>dapB17::Mu, l⁻, relA1, spoT1, thi-1</i>	Bukhari & Taylor (1971)
<i>Rhizobium meliloti</i>		
GR4	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	Casadesús & Olivares (1979)
GRP4	Cepa derivada de GR4 curada de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b	A. Palomares (1975)
GRM6	Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4b	J. Mercado-Blanco
GRM8	Cepa derivada de GR4 curada de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b	J. Mercado-Blanco
GRM10	Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4a	J. Mercado-Blanco
2011	Cepa derivada de SU47	J. Denarié
Rm41	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	A. Kondorosi
102F34	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	G. Ditta
RMGRA	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en la EEZ (Granada)	P. Villadas
RMSA	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Riego de la Vega (León)	E. Martínez-Molina
RMS	Aislados de nódulos de <i>M. sphaerocarpa</i> en Riego de la Vega (León)	E. Martínez-Molina
RMA	Aislados de nódulos de <i>M. alba</i> en Riego de la Vega (León)	E. Martínez-Molina
SAN	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Naharros Nuevo (Salamanca)	E. Martínez-Molina
SAF	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Florida de Liébana (Salamanca)	E. Martínez-Molina
SAP	Aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> en Parada de Arriba (Salamanca)	E. Martínez-Molina
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>trifolii</i> RS1050	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	F. Rodríguez-Quiñones
bv. <i>phaseoli</i> 8002	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	A. W. B. Johnston
bv. <i>viciae</i> VF39	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺ ; Sm ^F	U. Prierer
<i>Rhizobium</i> sp.		
GRH2	Cepa silvestre aislada de nódulos de <i>Acacia cyanophylla</i> ; Nod ⁺ Fix ⁺	M.A. Herrera
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
A348	Cepa silvestre	E. W. Nester

c.- Medios de conservación

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se hizo por congelación rápida de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía suplementados de glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (V/V). Los criotubos se almacenan a una temperatura de -70°C, siendo viables durante varios años.

3.- Antibióticos

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones 100 veces concentradas de los mismos en agua desionizada o en mezclas agua/etanol en la proporción 1:1. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración a través de unidades Minisart^R NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron (mg.l⁻¹): Tetraciclina (Tc, SIGMA), 10; Kanamicina sulfato (Km, BOEHRINGER), 50 para *E. coli* y 180 para *Rhizobium*; Ampicilina (Ap, SIGMA), 200; Cloranfenicol (Cm, SIGMA), 50; Estreptomicina sulfato (Sm, CEPA), 50 para *E. coli* y 250 para *Rhizobium*; Espectinomicina (Sp, SIGMA), 100 para *Rhizobium*, Gentamicina sulfato (Gm, SIGMA), 10.

4.- Métodos de conjugación

a.- Cruces simples

Este tipo de cruces se efectuaron para movilizar plásmidos que contienen la región *mob* de RP4 (pSUP102 y pSUP202); para ello se utilizó como cepa donadora y

movilizadora *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983), que contiene y expresa los genes de transferencia (*tra*) de RP4 integrados en el cromosoma.

Para ello se mezclaron, habitualmente en la proporción 1:1, la cepa donadora, en fase logarítmica del crecimiento, con la receptora en su fase exponencial tardía. Donador y receptor se centrifugaron en un tubo de microfuga y se resuspendieron en un pequeño volumen de medio de cultivo (100-200 μ l). La mezcla se pone sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 μ m de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de TY-agar, y se incuba toda la noche a 28°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla de conjugación se resuspende en medio estéril y se efectúan las diluciones adecuadas, sembrándolas sobre medio selectivo (MM) adicionado de los antibióticos para cuya resistencia codifica el plásmido que se transfiere.

b.- Cruces triparentales

Con este modelo de cruce se efectuó la transferencia, desde cepas no movilizadoras de *E. coli*, de plásmidos no autotransmisibles que contienen el *oriT* del plásmido RK2 a *Rhizobium*, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980). El procedimiento seguido fue idéntico al de los cruces biparentales, utilizando, habitualmente, mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones 1:1:1.

5.- Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

a.- Magic Minipreps

Para disponer de forma rápida de un ADN plasmídico limpio y apto para secuenciación se usó el kit comercial de purificación "Magic MiniprepsTM" de PROMEGA, siguiendo en todas las etapas las indicaciones del fabricante.

b.- Magic Midipreps

De la misma manera indicada en el apartado anterior, se usó el kit comercial de purificación "Magic MidiprepsTM" distribuido por la misma casa (PROMEGA) para disponer de una mayor cantidad de ADN.

c.- Minipreparación de plásmidos con bajo peso molecular

Para el aislamiento rápido de plásmidos recombinantes de bajo peso molecular a partir de transformantes o transconjugantes se empleó el procedimiento de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981) y modificado por Sambrook *et al.*, (1989).

A partir de un cultivo bacteriano, crecido en agitación toda la noche, de la cepa de *E. coli* elegida se recogen las células en un tubo eppendorf mediante centrifugación de 1,5 ml durante 2 min. Las células se resuspenden en 100 μ l de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTANa₂ 10 mM) añadida inmediatamente antes de usar con 5 mg/ml de lisozima. Después de 5 min a temperatura ambiente se le añade 200 μ l de la solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) se mezcla por inversión rápida varias veces y se pone en hielo 5 min. Se añaden entonces 150 μ l de tampón acetato potásico pH 4,8 frío (para 100 ml de solución: 60 ml acetato potásico 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua), se agita y se deja en hielo durante 5 min. A continuación se centrifuga y se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo, luego se extrae con 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1),

8.- Tratamiento enzimático del ADN

Las digestiones con enzimas de restricción, defosforilaciones y ligaciones se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima específica, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por las casas comerciales (BOEHRINGER y PROMEGA), y las recomendaciones descritas en Sambrook *et al.* (1989).

Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 μg de ADN, 0,1 volumen del tampón correspondiente suministrado por la casa comercial, diez veces concentrado y 0,5-1 unidad del enzima a utilizar, en volúmenes finales de 10-25 μl completados con agua destilada. Estas reacciones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante, o bien (en algunos casos) dando pulsos de 10 segundos en microondas a media potencia con intervalos de 10 segundos durante un minuto y medio.

a.- Digestiones múltiples de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón. Cuando no era el caso, y siempre que fuera posible, se digirió primero con la enzima que actúa en el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando no fue factible, se llevó a cabo la digestión con una enzima, se fenolizó y se precipitó el ADN, resuspendiéndolo en el tampón adecuado para la segunda enzima y llevando a cabo la segunda digestión.

b.- Relleno de extremos 5' provenientes de una restricción

