

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín (CSIC) – Granada



TESIS DOCTORAL

**MUTUALISMO Y PATOGÉNESIS:
IMPORTANCIA DE GENES IMPLICADOS EN VIRULENCIA
PARA EL ESTABLECIMIENTO
DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA**

JUAN JOSÉ OLIVA GARCÍA

Granada, 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Juan José Oliva García
D.L.: GR. 2349-2008
ISBN: 978-84-691-7268-1

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín (CSIC) – Granada

MUTUALISMO Y PATOGÉNESIS: IMPORTANCIA DE GENES IMPLICADOS EN VIRULENCIA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas

Juan José Oliva García para aspirar al Grado de Doctor

Fdo: Juan José Oliva García

VºBº Los Directores del trabajo

**Fdo: María José Soto Misffut
Doctora en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC**

**Fdo: José Olivares Pascual
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del CSIC**

Granada, 2008

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

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones, o están en preparación:

Congresos:

- Soto, M.J., van Dillewijn, P., Oliva-García J.J., Sanjuán, J. y Olivares J. (2003) “*Sinorhizobium meliloti* Tep1: a transmembrane efflux protein that affects nodule formation on alfalfa”. XI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions San Petersburgo (Rusia)
- Oliva-García J.J., van Dillewijn, P., Sanjuán, J., Olivares, J., y Soto, M.J. (2004) “Caracterización del gen *pgi* en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa”. X Reunión Nacional de la Sociedad Nacional de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada (España)
- Oliva-García J.J., van Dillewijn, P., Sanjuán, J., Olivares, J., y Soto, M.J. (2004) “Characterization of the *pgi* (phosphoglucose isomerase) gene of *Sinorhizobium meliloti* and its involvement in symbiosis”. VI European Nitrogen Fixation Conference. Toulouse (Francia)
- Soto, M.J., Oliva-García, J.J., Pérez-Mendoza, D., Blanca-Ordóñez, H., Herrera-Cervera, J.A., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2005) “Functional characterization and regulation of a *Sinorhizobium meliloti* type IV secretion system”. XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Mérida (México)
- Oliva-García J.J., Scharf, B., Raz, A., Sanjuán, J., Olivares, J. y Soto, M.J. (2006) “Purificación y análisis funcional de una fosfoglucoisomerasa (PGI) tipo eucariota de *Sinorhizobium meliloti*. Expresión en vida libre y simbiosis”. XI Reunión Nacional de la Sociedad española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Madrid (España)
- Oliva-García J.J., Blanca-Ordóñez, H., Pérez-Mendoza, D., Olivares, J., Sanjuán, J. y Soto, M.J. (2006) “The VirB system of *Sinorhizobium meliloti*: Role in conjugal transfer and symbiosis with legume plants”. 2nd Congress of European Microbiologist (FEMS). Madrid (España)

Publicaciones:

- Soto, M.J., Oliva-García J.J., Sanjuán, J. y Olivares J. *Simbiosis mutualista Rhizobium-leguminosa versus patogénesis* (2006) En "Fijación de nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. pp. 144 - 154 " Editores: Bedmar, E., González, J., Lluch, C., y Rodelas, B.
- Soto, M.J., Oliva-García J.J., Pérez-Mendoza, D., Blanca-Ordóñez, H., Herrera-Cervera. J.A., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2006) En "Biology of Plant-Microbe Interactions". pp. 484-488 Vol. 5. Editores: F. Sánchez, C. Quinto, I. López-Lara, O. Geiger.
- Oliva-García J.J., van Dillewijn, P., Lucas, M., Sanjuán, J., Olivares, J., y Soto, M.J. *The SMc02163 gene of S. meliloti codes for a conventional eukaryotic-like phosphoglucose isomerase which is required for efficient nodulation in alfalfa plants.* (En preparación)
- Oliva-García J.J., Raz, A., Sanjuán, J., Olivares, J. y Soto, M.J. *Phosphoglucose isomerase encoded by the S. meliloti gene acts as a cytokine with tumor autocrine motility factor (AMF) function.* (En preparación)
- Blanca-Ordóñez, H., Oliva-García, J.J., Pérez-Mendoza, D., Olivares, J., Soto, M.J., y Sanjuán, J. *Conjugal transfer of rhizobial megaplasmids pSyms by the virB system of S. meliloti* (En preparación)

Agradecimientos

Desde estas líneas no puedo ni debo dejar de expresar mi total gratitud a tantas personas que me han ayudado a superar los obstáculos y alcanzar las metas.

A la Fundación Ramón Areces por la concesión de una beca para el desarrollo de esta tesis doctoral.

A mis directores de tesis María José Soto y José Olivares por su entusiasmo y disponibilidad en este trabajo. A “Don José” por ser un referente en el mundo de la ciencia llevado con una humildad incomparable. A María José Soto, por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la ciencia, por su infinita paciencia, ánimo para que siguiera adelante, compromiso y por su espíritu de lucha, ante las dificultades.

A Juan Sanjuán, por invitarme a formar parte de esta “familia” en que se basa este grupo de investigación, por sus ánimos y apoyo en todo momento y por estar ahí cuando los he necesitado. Espero que algún día nos toque la “primitiva” que tanto añoramos.

A esa “pequeña-gran familia” del laboratorio por lo mucho que hemos vivido juntos. Porque aun con mis defectos siempre me habéis apoyado en todo animándome y confiado en mi valía. Gracias a vuestro estímulo, “lo que era, no es lo que soy, lo que soy, no es aún lo que puedo ser”.

A Birgit Scharf del Dpto. de Genética de la Universidad de Regensburg por su ayuda, apoyo y consejos durante mi estancia en tierras germanas. Asimismo a todos los compañeros de su laboratorio por su disponibilidad dentro y fuera del trabajo. Gracias por deleitarme con la tradicional cerveza de Baviera.

A Mercedes Lucas del Dpto. de Fisiología y Ecología Vegetal del Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC) de Madrid, por su cercanía y colaboración con la microscopía.

A Abraham Raz, del “Institute Karmanos Cancer” en Detroit (USA) por su contribución en la actividad AMF de la proteína PGI de *S. meliloti*.

A Carmen Lluch, tutora de los cursos de Doctorado, por su disponibilidad siempre que la he necesitado.

A los que más cerca he tenido, esos que no hace falta citarlos, porque estuvieron siempre ahí para atender mis preguntas, comprender mis miradas perdidas, animar mis sinsabores, y celebrar mis éxitos. Para aquellos con los que he compartido poyata, fines de semana, puentes y miles de horas con “rondas de madrugada”. A los de las comidas en casa, los cientos de “tupper”, el fútbol de cada semana, los ratitos del “sofá”, las inexistentes doradas de salobreña, el chiste de la semana, los “boyetes”, el “ya es viernes”, un “chaguarma” vespertino tras el “guayabeo”, una coplilla de carnaval, mil ensayos de sainete. A los que no se rendirán, al que lleva su “naranja” con orgullo aun exprimido, al que sabe cuidar a los suyos como norma de vida, a los que se fueron y dejaron huella. Por vuestra compañía, risas, comprensión y disfrute, a todos por tanto GRACIAS.

A mis padres y familia, por enseñarme que la humildad es el mejor de los honores, el cariño, el respeto, la pasión por un futuro y la bondad sin rencores la más alta distinción. Por inculcarme que cada instante de tu vida tiene sentido si aprendes de él, que en la vida no se sigue adelante celebrando éxitos sino superando dificultades. Porque sin reconocimiento académico en vuestras vidas, para mi sois *cum laude*. De orgullo me llena ser parte vuestra y teneros como ejemplo.

A Marina, por rescatarme cuando lo necesité, por su cariño y sonrisa fiel, por ayudarme a ver las cosas en su justa medida, con ojos claros, por darle color a la vida, por su increíble sensatez. Por ser de entre todos la primera, por ser dentro de mi quién es.

Para todos los olvidados mis disculpas

Para los citados conocerlos fue un placer

Para aquellos que merecen una frase

lo siento

“hasta aquí, puedo leer”

Un , Dos, Tres®

A Marina por darle luz a mi vida

A mi familia, por su incansable apoyo y cariño

A todos mis amigos por arrancarme siempre una sonrisa

*Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa.*

(Mahatma Ghandi)

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Δ	Incremento
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ap	Ampicilina
ARA	Actividad reductora de acetileno
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
bv	Biovariedad
cDNA	DNA complementario
cfu	Unidades formadores de colonia
cm	Centímetros
D.O./ DO	Densidad óptica medida a la longitud de onda indicada
Da	Dalton
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacárido
<i>et al.</i>	Y colaboradores
Fig.	Figura
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución
Fruct	Fructosa
g	Gramos
Gluc	Glucosa
Gm	Gentamicina
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
K _m	Constante de Michaelis-Menten
Km	Kanamicina
KPS	Polisacáridos capsulares
l	Litros
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
MES	Ácido morfolinoetanosulfónico
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
MM	Medio mínimo
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
N ₂	Nitrógeno molecular
NADP ⁺ /H	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
ng	Nanogramo

nm	Nanometro
nmol	Nanomol
°C	Grados centígrados
ORF	Marco de lectura abierto
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PBS	Solución de tampón fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNPG	P-nitrofenil-β-D-glucurónido
pp.	Páginas
prot	Proteína
PSPA	Peso seco de la parte aérea
pSym	Plásmido simbiótico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Estreptomina
sp.	Especie
Spc	Espectinomicina
TBE	Tampón tris-borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
V	Voltios
V _{max}	Velocidad máxima
X-gal	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactósido
X-gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucurónido
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
1. PROCESO DE INFECCIÓN Y DESARROLLO DEL NÓDULO	3
2. INTERCAMBIO DE SEÑALES ENTRE <i>Rhizobium</i> Y LA LEGUMINOSA	5
2.1. Intercambio inicial de señales	6
2.2. Polisacáridos de superficie	8
2.2.1. Glucanos cíclicos ó β-glucanos	9
2.2.2. Exopolisacáridos (EPS)	10
2.2.3. Polisacáridos capsulares (KPS) o antígenos K	11
2.2.4. Lipopolisacáridos (LPS)	12
2.3. Proteínas secretadas por <i>Rhizobium</i>	13
2.4. Señales de quorum sensing	15
3. RESPUESTAS DE DEFENSA IDENTIFICADAS DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>-LEGUMINOSA	17
3.1. Inducción de genes de la ruta fenilpropanoide	19
3.2. Acumulación de fitoalexinas	20
3.3. Respuesta de hipersensibilidad (HR)	20
3.4. Producción de ácido salicílico (SA)	21
3.5. Expresión de proteínas relacionadas con patogénesis (PR)	21
3.6. Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	22
3.7. Producción de óxido nítrico (NO)	23
3.8. Producción de etileno (ET)	24
4. CONTROL DE LA RESPUESTA DEFENSIVA POR <i>Rhizobium</i>	24
a) Factor Nod	25
b) Polisacáridos superficiales (SPS)	25
c) Inhibidores de la síntesis de ET	26
d) Sistemas antioxidantes	26
5. GENES DE VIRULENCIA DE PATÓGENOS PRESENTES EN <i>Rhizobium</i>	27
5.1. BacA	27
5.2. Sistemas reguladores de dos componentes (2-CRS)	28
5.3. Sistemas de secreción tipo III (T3SS)	29
5.4. Sistemas de secreción tipo IV (T4SS)	30

5.5. FadD	31
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	41
1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	41
1.2. Medios de cultivo	45
1.3. Conservación de cepas bacterianas	48
1.4. Antibióticos	48
1.5. Transferencia conjugativa en condiciones de laboratorio	49
1.5.1. Conjugaciones biparentales	49
1.5.1. Conjugaciones triparentales	50
1.6. Selección de intercambio alélico y co-integración	50
1.7. Ensayo de movimiento multicelular (swarming)	51
2. TÉCNICAS ANALÍTICAS	51
2.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa en cultivos celulares	51
2.2. Determinación del contenido en proteína (reactivo de Bradford)	53
2.3. Aislamiento y cuantificación de exopolisacáridos bacterianos	53
2.4. Obtención de extracto celular para medida de actividad fosfoglucoisomerasa (PGI)	54
2.5. Actividad enzimática fosfoglucoisomerasa (PGI)	55
2.6. Medida de la actividad nitrogenasa	56
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	57
3.1. Aislamiento de ADN plasmídico	57
3.2. Aislamiento de ADN genómico total	60
3.3. Aislamiento de ARN total	62
3.4. Determinación de la concentración de ADN y ARN	63
3.5. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	63
3.6. Identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en geles de agarosa	64
3.6.1. Electroforesis de ADN	64
3.6.2. Revelado de geles y fotografía	64

3.6.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción	64
3.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de azarosa	65
3.8. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	66
3.8.1. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 5'	66
3.8.2. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 3'	67
3.9. Eliminación de ADN contaminante en muestras de ARN total	67
3.10. Determinación de la calidad del ARN total	68
3.11. RT-PCR	68
3.12. Transformación celular	68
3.12.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con CaCl ₂ /MgCl ₂	69
3.12.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	70
3.12.3. Preparación de células electrocompetentes	70
3.12.4. Electroporación	70
3.13. Experimentos de hibridación ADN-ADN	71
3.13.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon	71
3.13.2. Marcaje de sondas de ADN no radioactivas	72
3.13.3. Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactiva	73
3.14. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	75
3.15. Cebadores utilizados	75
3.16. Secuenciación de ADN	76
3.16.1. Secuenciación de ADN de doble cadena	76
3.17. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	77
3.17.1. Preparación de los geles	77
3.17.2. Electroforesis	78
3.17.3. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida	79
3.17.4. Conservación de geles de poliacrilamida	80
3.18. Estimación de la masa molecular de proteínas en condiciones nativas	80
3.19. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	81
3.20. Revelado inmunológico	81
3.21. Aislamiento de proteínas secretadas en los sobrenadantes de cultivos de <i>S. meliloti</i>	82

3.22. Sobre-expresión y purificación de la proteína SMc02163 de <i>S. meliloti</i>	83
3.23. Obtención y purificación de anticuerpos policlonales	85
3.23. Transducción generalizada	85
3.24. Determinación del número de fagos	86
4. ENSAYOS CON PLANTAS	86
4.1. Esterilización y germinación de semillas	86
4.2. Solución nutritiva para plantas	88
4.3. Reaislamiento de <i>Rhizobium</i> de nódulos de leguminosas	89
4.4. Ensayo de adsorción de <i>Rhizobium</i> a raíces de alfalfa	89
4.5. Ensayo de colonización de <i>Rhizobium</i> a raíces de alfalfa	91
4.6. Cultivo de plantas	92
4.6.1. Cultivo axénico de tubos	92
4.6.2. Cultivo en jarras Leonard	92
4.6.3. Medida del grado de infectividad	93
4.6.4. Medida del grado de competitividad	93
4.6.5. Medida del peso seco de la parte aérea	93
4.6.6. Cultivo en macetas de plantas de tomate	94
4.7. Aislamiento de fracción bacteroidal	94
4.8. Ensayo de tumorogénesis en plantas de tomate	95
4.9. Tinción de actividad β -galactosidasa <i>in planta</i>	95
4.9.1. Detección en raíces de alfalfa	95
4.9.2. Detección en secciones de nódulos	96
4.10. Análisis de estructura nodular mediante técnicas de microscopía	97
4.10.1. Procesamiento de las muestras	97
4.10.1.1. Inclusión y polimerización de las muestras	97
4.10.1.2. Seccionamiento de las muestras	97
4.10.2. Microscopía óptica de campo claro	98
4.10.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	98
5. PROGRAMAS Y RECURSOS BIOINFORMÁTICOS UTILIZADOS	99
 <i>CAPÍTULO I: RESULTADOS</i>	 103
 1. ANTECEDENTES	 103

2. ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LA REGIÓN <i>fadD</i> DE <i>S. meliloti</i>	104
3. ANÁLISIS <i>in silico</i> Y FILOGENÉTICO DE SMc02163	109
4. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN SMc02163 DE <i>S. meliloti</i>	115
4.1. Complementación del fenotipo de un mutante <i>pgi</i> de <i>E. coli</i>	115
4.2. Obtención de un mutante SMc02163 de <i>S. meliloti</i>	116
4.3. Caracterización del mutante 1021 <i>pgi</i> de <i>S. meliloti</i>	121
4.3.1. Actividad PGI	121
4.3.2. Crecimiento en distintas fuentes de carbono	122
4.3.3. Implicación del gen <i>pgi</i> en el control del swarming	126
4.3.4. Producción de exopolisacáridos (EPS)	127
4.3.5. Capacidad de osmoadaptación	127
4.3.6. Eficiencia de nodulación y fijación de nitrógeno	130
4.3.7. Expresión de genes <i>nod</i>	137
4.3.8. Adsorción y colonización a raíces de alfalfa	138
4.4. Estudios <i>in vitro</i>	140
4.4.1. Purificación de la proteína codificada por SMc02163	140
4.4.2. Caracterización bioquímica de la proteína SMc02163	143
4.4.3. Actividad citoquina AMF (factor autocrino de motilidad) de la proteína SMc02163 en células tumorales	146
4.5. Análisis de expresión del gen SMc02163	148
4.5.1. Obtención y especificidad de anticuerpos policlonales anti-SMc02163	149
4.5.2. Análisis de expresión del gen <i>pgi</i> en condiciones de vida libre	150
4.5.3. Análisis de expresión del gen SMc02163 en condiciones simbióticas	155
 CAPÍTULO I: ANEXO	 161
 Anexo I.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS CLONES pPGI400 y pPGI500	 161
Anexo I.2. CONSTRUCCIÓN DE pSTEP4 Y pSUP202pol4<i>pgi</i>	163
Anexo I.3. CONSTRUCCIÓN DEL CLON pTYB2-<i>pgi</i>	165
Anexo I.4. CONSTRUCCIÓN DEL CLON pMPPGI	165
 CAPÍTULO I: DISCUSIÓN	 169

CAPÍTULO II: RESULTADOS	183
1. ANTECEDENTES	183
2. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN <i>virB</i> DE <i>S. meliloti</i>	187
2.1. Análisis <i>in silico</i> de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i>	187
2.2. Función de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> en el establecimiento de simbiosis con leguminosas	189
2.2.1. Fenotipo simbiótico de mutantes <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i>	190
2.2.2. Fenotipo simbiótico de mutantes <i>rctA</i> de <i>S. meliloti</i>	195
2.3. Análisis funcional de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> como sistema de secreción tipo IV (T4SS)	196
2.3.1. Complementación del fenotipo avirulento de mutantes <i>virB</i> de <i>A. tumefaciens</i>	196
2.3.2. Papel de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> en transferencia conjugativa de ADN	199
2.4. Estudios de expresión de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i>	200
2.4.1. Expresión en <i>S. meliloti</i>	201
2.4.2. Expresión en <i>Agrobacterium</i>	204
2.5. Identificación de hipotéticas proteínas secretadas por el sistema VirB de <i>S. meliloti</i>	205
CAPÍTULO II: ANEXO	211
Anexo II.1.-CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES EN EL SISTEMA VirB DE <i>S. meliloti</i>	211
Anexo II.2.-CONSTRUCCIÓN DE pBvirB5	215
Anexo II.3.-CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES DE GENES DE LA REGIÓN <i>virB</i> DE <i>S. meliloti</i>	215
II.3.1. Construcción de fusiones transcripcionales SMA1322:: <i>lacZ</i>	215
II.3.2. Construcción de fusiones transcripcionales <i>virB1</i> :: <i>lacZ</i>	216
Anexo II.4.-CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES <i>fliF</i> Y <i>virBfliF</i> DE <i>S. meliloti</i>	217
CAPÍTULO II: DISCUSIÓN	221

CONCLUSIONES 233

BIBLIOGRAFÍA 239

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura Int.1. Representación esquemática del proceso de infección y desarrollo de un nódulo indeterminado.	4
Figura Int.2. Estructura del factor Nod.	6
Figura Int.3. Esquema del sistema de señalización entre el rizobio y la leguminosa.	8
Figura Int.4. Estructuras de distintos polisacáridos de superficie descritos en <i>Rhizobium</i> .	9
Figura Int.5. Estructura de autoinductores presentes en <i>Rhizobium</i> .	16
Figura Int.6. Modelo propuesto para la interacción de señales reguladoras de la respuesta defensiva en <i>Rhizobium</i> .	19
Figura Int.7. Estructura hipotética del T3SS de <i>R. sp.</i> NGR234.	30
Figura Int.8. Estructura hipotética del sistema de secreción tipo IV de <i>A. tumefaciens</i> .	31
Figura R.I.1. Mapa genético de la región <i>fadD</i> de <i>S. meliloti</i> 1021	105
Figura R.I.2. Mapa genético de la región <i>fadD</i> de distintas bacterias del orden <i>Rhizobiales</i> .	106
Figura R.I.3. Región intergénica <i>fadD-pgi</i> de <i>S. meliloti</i> .	107
Figura R.I.4. Secuencias RIME3 presentes en los genomas de <i>S. meliloti</i> y <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	108
Figura R.I.5. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región intergénica de los genes <i>fadD</i> y <i>pgi</i> en las bacterias <i>S. meliloti</i> y <i>S. medicae</i> .	109
Figura R.I.6. Clasificación de las proteínas con actividad PGI.	110
Figura R.I.7. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de SMc02163 con una proteína homóloga en <i>M. loti</i> y con proteínas PGI funcionalmente caracterizadas de <i>E. coli</i> y de humanos.	111
Figura R.I.8. Relación filogenética de proteínas con actividad PGI, entre las que se incluyen SMc02163 y otras dos proteínas codificadas en el genoma de <i>S. meliloti</i> 1021.	113
Figura R.I.9. Crecimiento de cepas silvestre y mutante <i>pgi</i> de <i>E. coli</i> en medio mínimo M9 con fructosa o glucosa como única fuente de carbono.	114
Figura R.I.10. Crecimiento en medio mínimo M9 con glucosa como única fuente de carbono de las cepa silvestre (PP6) y mutante <i>pgi</i> (KK52) de <i>E. coli</i> en ausencia y presencia de las construcciones pPGI400 y pPGI500.	115
Figura R.I.11. Actividad enzimática PGI presente en extractos crudos de las cepa silvestre (PP6) y mutante <i>pgi</i> (KK52) de <i>E. coli</i> en presencia y ausencia de las construcciones pPGI400 y pPGI500.	116

Figura R.I.12. Comprobación mediante hibridación de ADN total digerido con <i>EcoRI</i> de posibles mutantes para el gen SMc02163 de GR4 y 1021 de <i>S. meliloti</i> obtenidos con el vector suicida pSTEP4.	118
Figura R.I.13. Hibridación de ADN genómico digerido con <i>EcoRI</i> de posibles mutantes SMc02163 de cepas de <i>S. meliloti</i> que contienen el plásmido pPGI400 o pPGI500.	119
Figura R.I.14. Comprobación de mutantes SMc02163 de <i>S. meliloti</i> 1021 obtenidos por transducción, mediante hibridación del ADN genómico digerido con <i>EcoRI</i> (izquierda) y con <i>PstI</i> (derecha), usando como sonda un fragmento <i>EcoRI</i> del plásmido pPGI4.	121
Figura R.I.15. Actividad enzimática PGI presente en extractos celulares de cepas silvestre y mutante <i>pgi</i> de <i>S. meliloti</i> .	122
Figura R.I.16. Esquema del metabolismo de carbohidratos de <i>S. meliloti</i> .	123
Figura R.I.17. Curvas de crecimiento de <i>S. meliloti</i> 1021 y el mutante 1021pgi en medio mínimo líquido con distintas fuentes de carbono.	124
Figura R.I.18. Crecimiento de 1021 y 1021pgi en medio mínimo conteniendo una mezcla de glucosa (0,5 %) y fructosa (0,5 %) como fuentes de carbono.	125
Figura R.I.19. Curvas de crecimiento de <i>S. meliloti</i> 1021 y 1021pgi en medios TY y LB líquidos.	125
Figura R.I.20. Swarming de la cepa silvestre 1021 y el mutante 1021pgi de <i>S. meliloti</i> en placas de MM semisólido y glicerol 0,5 % como fuente de carbono.	126
Figura R.I.21. Influencia de distintas concentraciones de NaCl en las curvas de crecimiento de la cepa silvestre y mutante <i>pgi</i> de <i>S. meliloti</i> en MM (KNO ₃ + glucosa)	128
Figura R.I.22. Expresión de la fusión transcripcional <i>otsA::gusA</i> en <i>S. meliloti</i> 1021 y 1021pgi en medios con glucosa o glicerol, en ausencia y presencia de 400 mM NaCl.	129
Figura R.I.23. Capacidad infectiva y competitiva de cepas de <i>S. meliloti</i> 1021.	132
Figura R.I.24. Eficiencia fijadora de distintas cepas de <i>S. meliloti</i> determinada mediante (A) medida del peso seco de parte aérea, (B) actividad reductora de acetileno (ARA) y (C) contenido en N de plantas de alfalfa.	133
Figura R.I.25. Estructura al microscopio óptico de secciones longitudinales de nódulos de alfalfa inducidos por la cepa silvestre 1021 y mutante 1021pgi .	135
Figura R.I.26. Ultraestructura de nódulos de alfalfa de 33 dpi inducidos por cepa silvestre y mutante <i>pgi</i> de <i>S. meliloti</i> 1021.	137
Figura R.I.27. Actividad β-galactosidasa presente en las cepas 1021 y 1021pgi <i>S. meliloti</i> conteniendo las fusiones transcripcionales <i>npt::lacZ</i> y <i>nodC::lacZ</i> , crecidas en dos fuentes de carbono distintas y en ausencia (A) o presencia (B) del inductor luteolina (5 μM)	138
Figura R.I.28. Colonización de raíces de alfalfa por las cepas 1021 y 1021pgi de <i>S. meliloti</i> a distintos tiempos de incubación (hpi).	140
Figura R.I.29. Esquema de expresión y purificación de la proteína codificada por el gen <i>SMc02163</i> mediante el sistema IMPACT TM -CN	141

Figura R.I.30. Expresión de la proteína de fusión de pTYB2- <i>pgi</i> en la cepa ER2566 de <i>E. coli</i> .	142
Figura R.I.31. Purificación de la proteína SMc02163.	143
Figura R.I.32. Propiedades enzimáticas de la actividad PGI de SMc02163.	144
Figura R.I.33. Determinación de los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la proteína SMc02163 mediante diagrama de Lineweaver-Burk.	144
Figura R.I.34. Determinación de la constante K_i de la proteína SMc02163 mediante diagrama a distintas concentraciones de inhibidor (6-fosfogluconato).	145
Figura R.I.35. Separación electroforética de la proteína SMc02163 purificada en gel de acrilamida-bisacrilamida en condiciones nativas.	146
Figura R.I.36. Actividad citoquina asociada a la proteína SMc02163 de <i>S. meliloti</i>	148
Figura R.I.37. Inmunodetección de proteína SMc02163 en extractos totales de células de <i>S. meliloti</i> y extractos de nódulos de alfalfa (26 dpi) inducidos por distintas cepas de <i>S. meliloti</i>	149
Figura R.I.38. Expresión de la fusión transcripcional SMc02163:: <i>lacZ</i> en <i>S. meliloti</i> 1021 en respuesta a un incremento súbito de la osmolaridad del medio con 300 mM de NaCl.	152
Figura R.I.39. Efecto en la expresión de SMc02163 de <i>S. meliloti</i> a la presencia de 300 mM de NaCl y la fase de crecimiento del cultivo.	153
Figura R.I.40. Efecto de la fase de crecimiento y de un estrés hipersalino en la expresión de <i>pgi</i> de <i>S. meliloti</i> 1021.	154
Figura R.I.41. Expresión de la fusión SMc02163:: <i>lacZ</i> en cultivos de <i>S. meliloti</i> 1021 en fase exponencial y estacionaria de crecimiento en medio mínimo con KNO ₃ como única fuente de nitrógeno y glucosa o succínico como fuentes de carbono.	155
Figura R.I.42. Localización histoquímica de la actividad β -galactosidasa en nódulos de alfalfa inducidos por cepas de <i>S. meliloti</i> 1021 conteniendo distintas construcciones.	156
Figura R.I.43. Morfología de bacteroides y células en vida libre de <i>S. meliloti</i> 1021.	157
Figura R.I.44. Inmunodetección de PGI en extractos de bacteroides y células en vida libre de <i>S. meliloti</i> 1021.	157
Figura A.I.1. Esquema de construcción de los clones pPGI400 y pPGI500	162
Figura A.I.2. Estrategia de obtención de los clones pSTEP4 y PSUP202 <i>pol4pgi</i> utilizados en la mutagénesis del gen SMc02163 (<i>pgi</i>) de <i>S. meliloti</i> .	164
Figura A.I.3. Estrategia de obtención del clon pMPPGI utilizado para el análisis de la expresión del gen SMc02163 (<i>pgi</i>) de <i>S. meliloti</i> .	166
Figura R.II.1. Arquitectura del sistema de secreción tipo IV (VirB/D4) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	184

Figura R.II.2. Representación gráfica del porcentaje de identidad de cada uno de los productos VirB de <i>S. meliloti</i> (VirB1 a VirB11 de izquierda a derecha) con sus correspondientes ortólogos en distintas bacterias.	187
Figura R.II.3. Mapa físico de regiones <i>virB</i> de distintas bacterias del orden <i>Rhizobiales</i> .	189
Figura R.II.4. Cinéticas de nodulación de cepas silvestres y mutantes <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> en plantas de alfalfa.	190
Figura R.II.5. Capacidad competitiva de las cepas GR4, GR4virB, 1021 y 1021virB en plantas de <i>M. sativa</i> .	191
Figura R.II.6. Cinéticas de nodulación de cepas silvestres y mutantes <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> GR4 y 1021 en plantas de <i>M. truncatula</i> .	191
Figura R.II.7. Influencia del sistema VirB en la capacidad de nodulación de cepas de <i>S. meliloti</i> GR4 y 1021 en leguminosas no hospedadoras.	193
Figura R.II.8. Aspecto de las estructuras (flechas rojas) inducidas por <i>S. meliloti</i> en raíces de leguminosas con las que no establece interacción compatible.	194
Figura R.II.9. Cinéticas de nodulación de plantas de alfalfa de las cepas silvestre y mutante <i>rctA</i> de <i>S. meliloti</i> .	195
Figura R.II.10. Capacidad infectiva en plantas de <i>M. truncatula</i> de cepas silvestre y mutante <i>rctA</i> de <i>S. meliloti</i> GR4.	196
Figura R.II.11. Aislamiento y perfil de restricción de cósmidos contienen la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i>	197
Figura R.II.12. Detalle de la aparición de tumores en plantas de tomate inoculadas con cepas de <i>A. tumefaciens</i> silvestres y mutantes <i>virB</i> complementados con cósmidos que contienen la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> .	198
Figura R.II.13. Representación esquemática de fusiones transcripcionales de los genes <i>virB1</i> y SMA1322 al gen <i>lacZ</i> .	201
Figura R.II.14. A) Organización de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> , mostrando el fragmento amplificado en las reacciones de RT-PCR. B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores.	203
Figura R.II.15. Perfil electroforético en geles SDS-12,5% PAGE de proteínas secretadas al medio de cultivo líquido TY por <i>S. meliloti</i> .	207
Figura A.II.1. Estrategia de obtención de las construcciones pKVIR400 y pKVIR600.	213
Figura A.II.2. Representación esquemática de la construcción de mutantes simples <i>virB</i> y dobles mutantes <i>rctAvirB</i> de <i>S. meliloti</i> .	214
Figura A.II.3. Comprobación mediante hibridación de mutantes <i>virB</i> y dobles mutantes <i>rctAvirB</i> de <i>S. meliloti</i> 1021, usando la construcción pKVIR400.	214
Figura A.II.4. Esquema de la construcción de las fusiones transcripcionales pMPVIR1011, pMPVIR2011, pMPVIR3011 y pMPVIR4011.	217
Figura A.II.5. Comprobación mediante hibridación de mutantes <i>fliF virB</i> de <i>S. meliloti</i> 1021.	218

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla MyM.1. Cepas utilizadas en este trabajo.	39
Tabla MyM.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.	41
Tabla MyM.3. Concentración final de antibióticos utilizados.	49
Tabla MyM.4. Cebadores utilizados en este trabajo.	75
Tabla R.I.1. Producción de polisacárido extracelular en cepas de <i>S. meliloti</i> .	127
Tabla R.I.2. Comparación de parámetros cinéticos de distintas proteínas con actividad PGI	145
Tabla R.I.3. Influencia del medio de crecimiento en la expresión del gen SMc02163 de <i>S. meliloti</i>	151
Tabla R.II.1. Frecuencia de transferencia de pSymA y pML122 desde distintas cepas donadoras de <i>S. meliloti</i>	200
Tabla R.II.2. Expresión de SMa1322 y <i>virB1</i> en distintas cepas de <i>S. meliloti</i> .	202
Tabla R.II.3. Influencia del medio de crecimiento y de luteolina en la expresión de la fusión pMPVIR1011.	204
Tabla R.II.4. Expresión de <i>virB1</i> de <i>S. meliloti</i> en cepas de <i>Agrobacterium</i> .	205

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del suelo del orden *Rhizobiales*, conocidas genéricamente como rizobios, son α -proteobacterias, Gram-negativas, que pertenecen a un número diverso de géneros (*Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Azorhizobium*, *Devosia* y *Methylobacterium*) (Ramírez Bahena, 2006). La característica más llamativa de estas bacterias es su capacidad de establecer, en condiciones limitantes de nitrógeno, asociaciones simbióticas mutualistas con plantas de la familia *Fabaceae*. Durante esta interacción, netamente beneficiosa para ambos organismos, los rizobios son capaces de invadir la raíz de la planta e inducir en ella la aparición de un nuevo órgano, el nódulo, donde una forma especializada y diferenciada de la bacteria, el bacteroide, es capaz de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, reduciendo el nitrógeno molecular atmosférico hasta amonio asimilable por la planta. El proceso de fijación recae en la presencia de una metaloenzima denominada nitrogenasa, con características comunes en todos los microorganismos fijadores, que precisa un elevado gasto energético, que es obtenido del suministro de dicarboxilatos procedentes de la planta (Prell & Poole, 2006; Trainer & Charles, 2006).

Una importante peculiaridad de esta interacción reside en el elevado grado de especificidad, de tal modo que, generalmente, cada rizobio es capaz de interactuar con una o muy pocas especies vegetales, normalmente muy relacionadas filogenéticamente. Sin embargo, hay también rizobios que presentan un rango de hospedador amplio, como es el caso de *Rhizobium* sp. NGR234, capaz de nodular al menos 112 géneros de leguminosas y una especie no leguminosa como *Parasponia* (Pueppke & Broughton, 1999). La especificidad de la simbiosis es el resultado del reconocimiento entre los dos socios, basado en un intercambio de señales químicas que desencadenan la inducción de programas genéticos específicos tanto en la planta como en la bacteria.

1. PROCESO DE INFECCIÓN Y DESARROLLO DEL NÓDULO

Las distintas etapas que se pueden reconocer durante la infección de una leguminosa por *Rhizobium*, que finaliza con el desarrollo de un nódulo, se esquematizan en la Figura Int.1. El preludeo a la infección se caracteriza por la atracción y el crecimiento de la bacteria en la rizosfera de la planta, procesos estimulados por una serie de compuestos exudados por la leguminosa. La composición de los exudados radicales es diversa y compleja, y varía en función del estado fisiológico de la planta, la

INTRODUCCIÓN

disponibilidad de nutrientes e incluso del tipo de microorganismos presentes (Dakora & Phillips, 2002). Durante el crecimiento en la rizosfera de una planta hospedadora, los rizobios detectan la presencia de flavonoides (Perret *et al.*, 2000; Fisher & Long, 1992; Hirsch *et al.*, 2001), compuestos fenólicos derivados del metabolismo secundario de las plantas, que inducen la expresión de los genes de nodulación bacterianos (*nod*) esenciales en el proceso de la simbiosis.

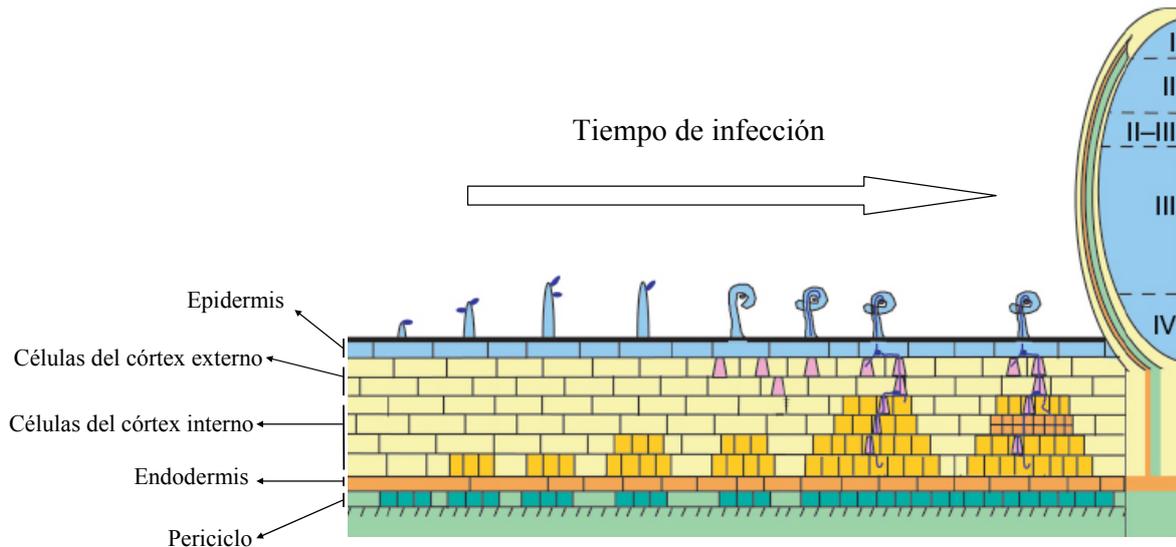


Figura Int.1. Representación esquemática del proceso de infección y desarrollo de un nódulo indeterminado. (Tomado de Mulder *et al.*, 2005).

En una siguiente etapa, las bacterias se unen a los pelos radicales de la planta de manera polar (Smit *et al.*, 1992). En este proceso de adhesión se han implicado a componentes bacterianos como rihadhesinas, polisacáridos superficiales y microfibrillas de celulosa, y lectinas vegetales, proteínas capaces de unir complejos glucosídicos. Una vez que se han unido los rizobios a los pelos radicales, se induce un cambio en la dirección de crecimiento apical del pelo radical, generándose una curvatura en la que quedan atrapados los rizobios. Es en este momento cuando tiene lugar la infección propiamente dicha, iniciada por una hidrólisis localizada de la pared celular vegetal en la que participan diversas actividades hidrolíticas de la bacteria (Mateos *et al.*, 2001). Tras la rotura de la pared celular del pelo radical, se produce una invaginación de la membrana citoplasmática dando lugar a una estructura tubular conocida como cordón de infección, a través de la cual los rizobios penetran en el interior del pelo radical. Este cordón de infección contiene una matriz de origen

bacteriano y glicoproteína de origen vegetal. Distintas condiciones fisiológicas vinculadas con la presencia de diferentes nutrientes en el entorno del cordón de infección, determinan la división bacteriana, que se postula puede ser el motor de avance del cordón de infección (Gage & Margolin, 2000).

Conjuntamente con el inicio del cordón de infección se produce la activación de la división de un conjunto de células del córtex de la raíz que formarán el primordio nodular. En leguminosas de climas templados, la división de células del córtex interno da lugar a nódulos de forma alargada conocidos como nódulos indeterminados. La existencia de un meristemo persistente en estos nódulos origina un gradiente de etapas de desarrollo, desde el meristemo en el extremo apical hasta el tejido senescente cercano a la raíz. Por su parte, en leguminosas de climas tropicales la división de células del córtex externo da lugar a nódulos de forma esférica o nódulos determinados, en los que la diferenciación de las células infectadas tiene lugar de modo sincrónico (Franssen *et al.*, 1992).

Los cordones de infección con las bacterias en su interior progresan ramificándose y atravesando las distintas capas de células de la raíz, dirigiéndose hacia el primordio nodular. Cuando el canal de infección alcanza las células del primordio, las bacterias son liberadas al citoplasma de estas células vegetales, en un proceso similar al de la endocitosis y en el que la bacteria queda rodeada por una porción de membrana de la célula vegetal que recibe el nombre de membrana peribacteroidal. En su interior, las células bacterianas son capaces de dividirse una o unas cuantas veces, antes de sufrir un proceso de diferenciación que los convertirá en bacteroides fijadores de nitrógeno. Al conjunto constituido por uno o varios bacteroides rodeados por una membrana peribacteroidal se le conoce con el nombre de simbiosoma. Simultáneamente con la aparición de simbiosomas, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro.

2. INTERCAMBIO DE SEÑALES ENTRE *Rhizobium* Y LA LEGUMINOSA

La formación de un nódulo fijador de N es un proceso muy complejo que requiere un continuo y adecuado intercambio de señales entre planta y bacteria, responsables de la gran especificidad de esta interacción (Perret *et al.*, 2000; Bartsev *et al.* 2004; Jones *et al.*, 2007a) Dado que el tema de trabajo de esta Tesis Doctoral ha estado centrado en el estudio de componentes bacterianos, y debido al menor conocimiento de señales y receptores vegetales, nos centraremos fundamentalmente en las señales bacterianas requeridas en el proceso de invasión de la leguminosa.

2.1. Intercambio inicial de señales

La primera señal que inicia el diálogo molecular entre los simbioses está constituida por compuestos fenólicos procedentes de la raíz de la planta, fundamentalmente flavonoides. Estos compuestos, actuando a través del regulador transcripcional de la familia LysR, NodD, inducen en la bacteria la expresión de una batería de genes esenciales en el proceso de nodulación: genes *nod*, *nol* y *noe*. El resultado es la aparición de un conjunto de proteínas que participan en la síntesis y secreción de una molécula señal: el factor Nod (FN) o lipoquitooligosacárido (LCO).

El FN es un aminoazúcar de entre 3 a 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos mediante enlaces β -1,4, que presenta en el extremo no reductor un ácido graso. Dependiendo de la especie de *Rhizobium*, esta estructura básica presenta variaciones que confieren especificidad a la molécula. Las variaciones consisten en una serie de sustituyentes que “decoran” el esqueleto oligosacárido de la molécula (*N*-metil, *O*-acetil, *O*-carbamoil, fucosil, 2-*O*-Me-fucosil, 4-*O*-Ac-fucosil, acetil y sulfato), así como en la longitud y grado de saturación del ácido graso. (Spaink, 2000) (Figura Int.2.).

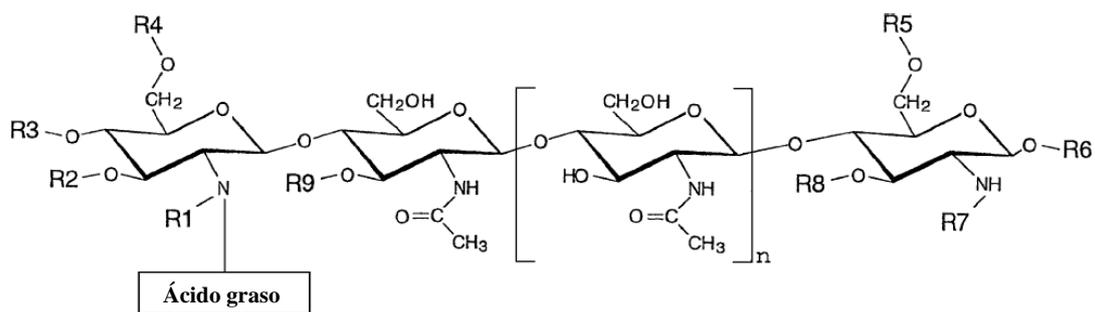


Figura Int.2. Estructura del factor Nod. Las sustituciones en la estructura se esquematizan como R1 – R9. n corresponde al grado de polimerización. (Tomado de Spaink, 2000.)

Muchas especies de rizobios son capaces de secretar una mezcla compleja de factores Nod. La variedad y naturaleza de la estructura de los factores Nod, así como la cantidad producida por cada especie de *Rhizobium* parecen ser también importantes, determinando en último término la nodulación y el rango de hospedador. De este modo, el factor Nod es considerado como uno de los elementos claves para la especificidad de la simbiosis (Perret *et al.*, 2000).

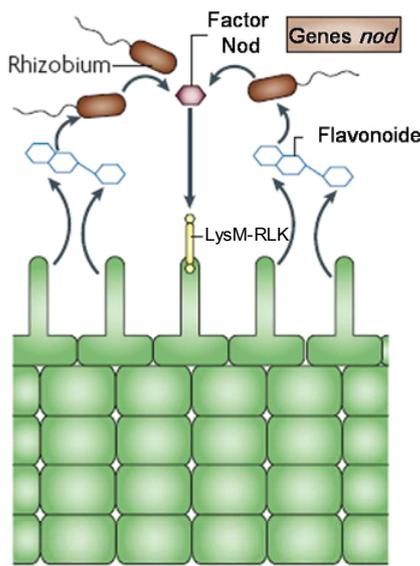
Los FN desencadenan en la planta numerosas respuestas, todas ellas esenciales en el proceso de invasión y organogénesis del nódulo: despolarización de la membrana celular, pulsos de calcio, deformación de los pelos radicales, activación de la

división de células del córtex que originarán el primordio nodular, formación del canal de pre-infección, expresión de nodulinas, e incluso control de la respuesta de defensa de la planta (Bueno *et al.*, 2001). Algunas de estas respuestas se inducen a concentraciones de FN tan bajas como 10^{-12} - 10^{-13} M, por lo que desde hace tiempo se sospechaba de la existencia en la planta de receptores de alta afinidad para los FN, cuya participación es necesaria para activar una cascada de señalización que en último término desemboca en cambios en expresión génica en la planta.

Hoy se sabe que el correcto reconocimiento de los FN requiere la participación de varias proteínas LysM-RLK (del inglés **Lysin Motive Receptor-Like Kinase**), receptores con dominio quinasa y que muestran dominios extracelulares con motivos ricos en lisina (Stacey *et al.*, 2006a); Udvardi & Scheible, 2005) (Figura Int.3.). Una señal secundaria generada tras el reconocimiento de los FN (quizás una entrada rápida de calcio), sería percibida por un segundo receptor simbiótico (SYMRK), otro receptor quinasa con dominios extracelulares con motivos ricos en leucina (LRR). Se piensa que la activación de estos receptores da lugar a la fosforilación de proteínas que desencadenarían la entrada de calcio extracelular y/o liberación de calcio desde reservorios intracelulares (en los que quizás podrían participar las canales catiónicos de membrana nuclear como DMI1 y de plastidios, CASTOR y POLLUX) hacia el citoplasma. Esto provocaría oscilaciones rítmicas de calcio, sobre todo alrededor del núcleo que podrían ser captadas por una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK o DMI3) que a su vez activaría por fosforilación factores transcripcionales de la familia GRAS (NSP1 y NSP2). NSP1 y NSP2 inducirían la expresión de genes de nodulinas requeridos para el curling y formación del nódulo.

Aunque los FN son esenciales para que *Rhizobium* pueda invadir la planta, y se desarrollen los nódulos, la bacteria requiere de otros componentes para conseguir la colonización e infección de la leguminosa. Entre ellos se encuentran: polisacáridos de superficie, proteínas secretadas y señales de quorum sensing.

A



B

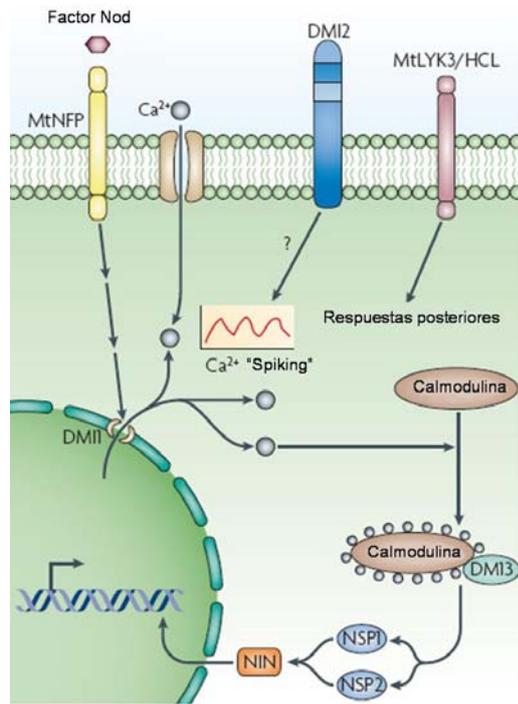


Figura Int.3. Esquema del sistema de señalización entre el rizobio y la leguminosa. **A)** Inducción de los genes *nod* tras la percepción de los flavonoides derivados de la planta. **B)** Cascada de señalización derivada de la percepción del factor Nod. Adaptadas de Jones *et al.*, 2008. La función de LysM-RLK, SYMRK, DMI1, DMI3, NSP2 y NIN se explica en el texto. LYK3/HCL constituye el receptor de entrada requerido en el inicio y desarrollo del canal de infección.

2.2. Polisacáridos de superficie

Rhizobium es capaz de producir cuatro tipos principales de polisacáridos superficiales (SPS) (Corzo Varillas *et al.*, 2006): glucanos cíclicos, lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (KPS) y exopolisacáridos (EPS) (Figura Int.4.). Estos compuestos han sido implicados en las distintas etapas requeridas durante el establecimiento de la simbiosis incluyendo desde la colonización de la raíz, formación del canal de infección e invasión del nódulo. Mutantes de *Rhizobium* defectivos en SPS o bien son incapaces de invadir la planta o bien aunque lo hacen, son defectivos en fijación de nitrógeno. En general, los exopolisacáridos (EPS, KPS y glucanos cíclicos) parecen ser esenciales en las etapas tempranas de la infección, mientras que los LPS son importantes en etapas más tardías de la interacción (Frayse *et al.*, 2003). A pesar de su esencialidad en la simbiosis, aún no se conoce con exactitud el papel que desempeña cada una de estas moléculas.

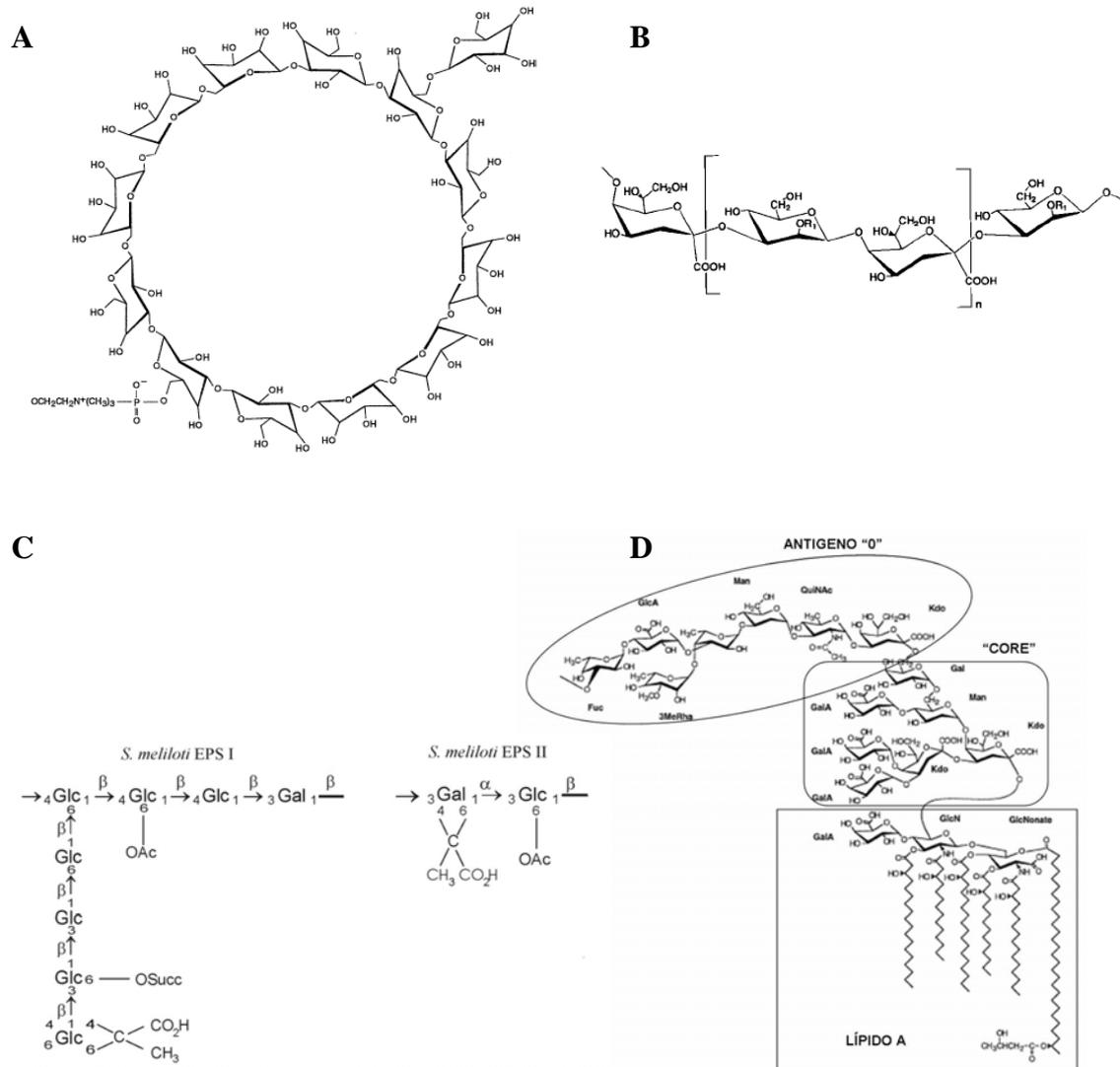


Figura Int.4. Estructuras de distintos polisacáridos de superficie descritos en *Rhizobium*. **A)** Estructura del cicloglucano β -(1,3) - β -(1,6) de *B. japonicum*. Tomado de Spaink, 2000. **B)** Estructura de la unidad polisacáridica repetida del antígeno capsular K (KPS) de *S. fredii* USDA257. Tomado de Forsberg & Reuhs, 1990. **C)** Estructura de las unidades repetidas presentes en los dos tipos de exopolisacáridos (EPS I y EPS II) de *S. meliloti*. Tomado de Skorupska *et al.*, 2006. **D)** Estructura del lipopolisacárido de *R. etli* CE3. Tomado de Spaink, 2000.

2.2.1. Glucanos cíclicos ó β -glucanos

Son moléculas formadas fundamentalmente por cadenas de 15 a 30 residuos de glucosa unidas de forma cíclica mediante enlaces glucosídicos β -(1,2) o β -(1,3) y β -(1,6) que presentan diversas sustituciones con grupos succinilo, metilmalonato o fosfoglicerol. Se encuentran mayoritariamente presentes en el espacio periplásmico aunque también pueden ser secretados al medio a través de un sistema de secreción tipo ABC. Las evidencias más significativas del papel de los glucanos cíclicos en la simbiosis provienen de bacterias mutantes en los genes *ndv* (*nodule development*)

implicados en la síntesis y transporte de estos polisacáridos. Mutantes *ndv* de *S. meliloti* y *S. fredii* inducen la formación de pseudonódulos, con canales de infección que abortan pronto, y por tanto carentes de bacteroides y no fijadores de N.

Han sido atribuidos distintos papeles a estos SPS. El hecho de que en condiciones de vida libre mutantes afectados en la síntesis de glucanos cíclicos presenten problemas en el crecimiento en un medio hipoosmótico, ha llevado a proponer que estas moléculas juegan un papel pasivo en la rápida adaptación de la bacteria a variaciones en la osmolaridad del medio con las que puede encontrarse durante las distintas etapas de la simbiosis (Dylan *et al.*, 1990). Además existen evidencias de que estos polisacáridos, como otros SPS, podrían tener un papel importante en el control de la respuesta defensiva de la planta, bien actuando como molécula señalizadora o bien como escudo protector de la bacteria (D'Haeze & Holsters, 2004). Así, la adición de glucanos cíclicos purificados de *Bradyrhizobium*, es capaz de suprimir reacciones de defensa vegetal inducidas por elicitores de patógenos (Mithöfer *et al.*, 1996), y mutantes de *Bradyrhizobium* defectivos en la síntesis de estos glucanos resultan ser más sensibles a fitoalexinas y a un pulso oxidativo (Mithöfer *et al.*, 2001).

2.2.2. Exopolisacáridos (EPS)

Constituyen un grupo de heteropolisacáridos que se acumulan en la superficie celular y se secretan al medio que rodea a la bacteria. Aunque se les ha asignado funciones inespecíficas como protección frente a estreses ambientales, unión a superficies o acumulación de nutrientes, también tienen un papel activo en el establecimiento de la simbiosis (Frayssé *et al.*, 2003).

Uno de los más estudiados es el sintetizado por *S. meliloti*, conocido como EPS I o succinoglucano, un polímero de unidades octasacarídicas constituidas por siete glucosas y una galactosa que presenta sustituciones con grupos acetilo, succinilo y piruvilo. En determinadas circunstancias (limitación de fósforo (Zhan *et al.*, 1991), o mutaciones que afectan a los genes reguladores *mucR* (Keller *et al.*, 1995) o *expR* (Pellock *et al.*, 2002)), *S. meliloti* sintetiza un segundo EPS conocido como EPS II o galactoglucano, un polímero del disacárido glucosa-galactosa sustituido con grupos acetilo y piruvilo. Para ambos EPS se encuentran a su vez dos especies de alto y bajo peso molecular, aunque parece ser la forma de bajo peso molecular la simbióticamente

activa. La producción de estas moléculas depende de la acción de los genes *exo* y *exp* localizados en el megaplásmido pSymB.

De manera similar a los LPS el efecto simbiótico de los EPS varía en función a la ontogenia nodular, siendo esenciales para el establecimiento de simbiosis efectivas en leguminosas que desarrollan nódulos de tipo indeterminado pero no en aquellas que forman nódulos de tipo determinado (Skorupska *et al.*, 2006; Fraysse *et al.*, 2003). El fenotipo de mutantes afectados en la síntesis de EPS sugiere que este polisacárido está implicado en la elongación y colonización del canal de infección, y en la prevención de la aglutinación bacteriana en el interior de éste (Skorupska *et al.*, 2006).

El hecho de que tanto la adición de cantidades picomolares de EPS purificados como la coinoculación con cepas isogénicas productoras de EPS puedan restaurar el defecto simbiótico de mutantes defectivos en EPS, apunta a la hipótesis de que estos polisacáridos funcionen como señal simbiótica que, al igual que el FN, debe ser reconocida por el correspondiente receptor en la planta aún no identificado.

Los EPS además parecen tener un papel importante en el control de la respuesta defensiva de la planta durante la interacción simbiótica. En el caso de *Azorhizobium caulidonans* se ha demostrado que el EPS forma una capa protectora que impide la entrada de H₂O₂ generada por la leguminosa durante el proceso de invasión (D'Haeze *et al.*, 2004). Por otro lado, mutantes de *S. meliloti* y *B. japonicum* afectados en la síntesis de EPS, inducen en sus hospedadores correspondientes respuestas típicas de defensa frente a patógenos, como alteraciones de la pared celular vegetal, acúmulo de compuestos fenólicos o producción de fitoalexinas (Niehaus *et al.*, 1993) (Parniske *et al.*, 1994). La prueba de que al menos el EPS I tiene un papel activo en el control de la respuesta defensiva la han conseguido (Niehaus *et al.*, 1996), demostrando que la adición del polisacárido purificado a cultivos celulares de alfalfa suprime la respuesta defensiva disparada por elicitores de levadura.

2.2.3. Polisacáridos capsulares (KPS) o antígenos K

El polisacárido capsular está compuesto por la repetición de una unidad disacáridica de naturaleza acídica (glucosa y ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico) (Kdo), que le confiere carga negativa y forma una red externa que rodea a la bacteria favoreciendo su adhesividad. Las enzimas implicadas en su síntesis están codificadas por los genes *rkp*.

En *Rhizobium*, los KPS, al igual que en otras bacterias, se piensa que contribuyen a la resistencia a diversos estreses abióticos (deseccación, condiciones hiperosmóticas, etc.). Además, como otros polisacáridos, pueden proteger a la bacteria de la acción nociva de productos de defensa sintetizados por la planta durante la invasión. Pero también existen evidencias del papel activo, probablemente señalizador, de estos polisacáridos durante la simbiosis. Mutantes de *S. meliloti* incapaces de sintetizar EPS pierden la capacidad de infectar alfalfa tras la mutación del gen *rkpZ* implicado en la distribución de tamaño del KPS (Reuhs *et al.*, 1995). El papel simbiótico, no obstante, parece ser dependiente de cepa y especie puesto que en *S. meliloti* 1021 el antígeno capsular no es simbióticamente activo. Por otro lado, en *S. fredii* HH103, el KPS es de vital importancia para su capacidad simbiótica ya que su ausencia afecta negativamente a la simbiosis, independientemente de si se produce o no EPS (Parada *et al.*, 2006). El papel activo propuesto para estos polisacáridos es el de promover el inicio y desarrollo del canal de infección (Becker *et al.*, 2005).

2.2.4. Lipopolisacáridos (LPS)

Son complejos glucolipídicos constituyentes principales de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Lugtenberg & van Alphen, 1983). Su estructura consiste en una región basal anclada a la membrana externa llamada lípido A, ligado a un núcleo oligosacárido o “core” desde el cual se ramifica hacia el ambiente una cadena oligosacáridica repetida de 3 a 5 azúcares, denominado antígeno O (Figura Int.4.D).

La estructura del LPS en los rizobios, al igual que ocurre en muchas otras bacterias, es altamente variable, siendo el antígeno O la porción que engloba el mayor número de cambios. Esta variabilidad entre las diversas cepas se encuentra a su vez incrementada por múltiples factores ambientales tales como el pH, la temperatura, la salinidad, el contenido en nutrientes, la fase de crecimiento del cultivo e incluso por su posible interacción con hospedadores. De este modo, se ha observado que la hidrofobicidad del LPS parece incrementarse en respuesta a la interacción con la planta justo antes de comenzar la infección (Becker *et al.*, 2005).

Los LPS podrían desempeñar varias funciones a lo largo de las diferentes etapas de la simbiosis: reconocimiento inicial, invasión de los pelos radicales, liberación de las bacterias al interior de las células vegetales y formación del simbiosoma (Becker *et al.*, 2005; Lerouge & Vanderleyden, 2002). El efecto simbiótico asociado a los LPS

difiere en función al tipo de nódulo desarrollado (determinado o indeterminado). Así, los fenotipos simbióticos más severos se han puesto de manifiesto en mutantes afectados en los LPS sobre plantas que desarrollan nódulos determinados. La posible explicación a este fenómeno podría estar asociada con la estructura interna de este tipo de nódulos, donde los canales de infección son más estrechos que en nódulos indeterminados. Debido a esto, se podría establecer un contacto más íntimo entre la bacteria y la planta, en el cual los LPS podrían tener una importante función.

El modo de acción de estos polisacáridos durante la interacción con la planta puede ser diverso (Becker *et al.*, 2005; Lerouge & Vanderleyden, 2002): i) Pueden actuar como inhibidores de la respuesta defensiva de la planta. Se ha comprobado que la adición de LPS purificado de *S. meliloti* o sólo el lípido A de este LPS, es capaz de inhibir reacciones rápidas de defensa (incremento de la concentración de H₂O₂ y alcalinización del medio) inducidas en un cultivo celular de alfalfa por un elicitor (Scheidle *et al.*, 2005) y ejercer influencias a más largo plazo que incluyen ajustes transcripcionales tras el ataque de un patógeno (Tellström *et al.*, 2007). ii) El LPS podría actuar como barrera física para ciertos compuestos tóxicos producidos durante el desarrollo de la simbiosis. iii) Funcionar como antígenos que mimetizan la interfase vegetal. iv) Dentro del nódulo, los LPS pueden facilitar a la bacteria la adaptación al entorno endosimbiótico. v) Funcionar como señal simbiótica. En apoyo de esta funcionalidad, el fenotipo simbiótico de un mutante de *A. caulinodans* afectado en la síntesis de LPS ha podido ser complementado total o parcialmente, tras la coinoculación con un mutante deficiente en factor Nod pero capaz de producir LPS, o tras la adición de LPS purificado, respectivamente (Mathis *et al.*, 2005).

2.3. Proteínas secretadas por *Rhizobium*

Además del factor Nod y polisacáridos superficiales, *Rhizobium* secreta una serie de proteínas que influyen en la capacidad de nodulación de la bacteria (Perret *et al.*, 2000; Broughton *et al.*, 2000). Un ejemplo de este tipo de proteínas es NodO, identificada sólo en dos especies de rizobios y secretada a través del sistema de secreción tipo I PrsDE. NodO es una proteína de unión a calcio, homóloga a la hemolisina de *E. coli*, que promueve el desarrollo de canales de infección en los pelos radicales (Walker & Downie, 2000). La presencia del gen *nodO* puede complementar parcialmente el defecto en nodulación de un mutante *nodEFL* de *R. leguminosarum* bv *viciae* (Downie & Surin, 1990) e incluso puede ampliar el rango de hospedador en

INTRODUCCIÓN

algunos rizobios (Economou *et al.*, 1990). La proteína NodO es capaz de originar *in vitro* canales específicos para cationes en membranas lipídicas, por lo que se cree que *in vivo* podría actuar creando también poros en las membranas de la célula vegetal para el movimiento de cationes implicados en la comunicación directa con la planta durante la simbiosis (Sutton *et al.*, 1994).

Algunos rizobios, utilizando el sistema de secreción tipo I PrsDE, exportan al medio glucanasas implicadas en la conversión de las formas de alto peso molecular de EPS a las de bajo peso molecular o exo-oligosacáridos que suelen ser las formas simbióticamente activas. Es el caso de las glucanasas PlyA y PlyB de *R. leguminosarum*, ExoK y ExsH de *S. meliloti* y ExoK de *Rhizobium* sp. NGR234. La presencia de estas proteínas controla la cantidad y tipo de exo-oligosacárido presente en el medio extracelular, pudiendo afectar al fenotipo simbiótico, como así se ha demostrado en *Rhizobium* sp. NGR234 (Stahelin *et al.*, 2006).

Numerosas especies de rizobios, entre las que no se encuentran *S. meliloti*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y algunas especies de *M. loti*, disponen de un sistema de secreción tipo III (T3SS) que a modo de jeringuilla molecular está encargado de inyectar al interior del citoplasma de la célula vegetal un grupo de proteínas denominadas Nops (**N**odulation **o**uter **p**roteins). Los T3SS en general y las Nops en particular tienen efectos diversos en la nodulación dependiendo de la planta hospedadora, pudiendo desde no tener efecto, hasta promover o bloquear el proceso de formación de nódulos. La expresión de los genes que codifican tanto el aparato de secreción como las proteínas secretadas está controlada por un regulador transcripcional cuya inducción requiere la participación de flavonoides específicos de la planta y el activador transcripcional NodD (Marie *et al.*, 2004). Aún no se conoce con exactitud cómo las Nops pueden afectar el proceso de formación de nódulos. Por analogía con los efectores de T3SS de bacterias patógenas, se piensa que las Nops podrían interferir con los mecanismos de defensa de la planta, bloqueándolos o activándolos a modo de Avr, dependiendo de cuál sea el hospedador. Un resultado que apoya esta hipótesis es el obtenido con la proteína NopL de *Rhizobium* sp. NGR234, ya que plantas transgénicas que expresan el gen *nopL* muestran supresión de ciertas respuestas de defensa (Bartsev *et al.*, 2004).

Como último ejemplo de proteínas secretadas por rizobios que intervienen activamente en la simbiosis, se encuentran Msi059 y Msi061, efectores de *M. loti* R7A translocados por un sistema de secreción tipo IV (T4SS) homólogo al sistema VirB/D4

de *Agrobacterium tumefaciens* (Hubber *et al.*, 2004). Mutaciones en los genes que codifican el T4SS o alguno de los dos efectores interfieren o promueven el proceso de infección dependiendo de la planta hospedadora, de manera similar a lo que ocurre con mutantes de otras cepas de *M. loti* afectados en el T3SS o Nops. Las proteínas secretadas por el T4SS en *M. loti* se cree que interfieren en la regulación de proteínas de la célula vegetal. Msi059 podría tener una función similar a la del efector XopD de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* que se sabe que en plantas muestra actividad proteasa sobre sustratos que han sufrido SUMOilación (Small Ubiquitin-like MOdifier). Msi061 podría funcionar como el efector VirF de *A. tumefaciens*, marcando una serie de proteínas para su ubiquitinación y posterior degradación (Hubber *et al.*, 2004).

2.4. Señales de quorum sensing.

Las comunidades bacterianas son capaces de regular de una forma precisa la expresión de un conjunto de genes con funciones muy diversas, en función de la densidad celular en la población. Este fenómeno de regulación génica descrito inicialmente en las bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri* y *V. harvey* (Fuqua *et al.*, 1994), se conoce como “quorum sensing”(QS) o percepción del quorum (número de individuos necesarios para que la población lleve a cabo la expresión conjunta de un grupo de genes). En la percepción del número de individuos juegan un papel clave pequeñas moléculas difusibles denominadas autoinductores, que en bacterias Gram-negativas suelen ser mayoritariamente acil-homoserina lactonas (AHLs), compuestos caracterizados por presentar un anillo homoserina conservado conectado a un grupo acilo variable. Conforme la densidad de población bacteriana aumenta se origina un incremento en la concentración del autoinductor hasta llegar a un nivel umbral, en el cual el autoinductor es capaz de interactuar con una serie de activadores transcripcionales de la familia LuxR, presentes en el citoplasma bacteriano. Una vez que han reconocido al autoinductor, estos activadores son capaces de reconocer una secuencia de ADN conservada en la región promotora de diversos genes, conocida como caja *lux*, provocando la activación o la represión de los genes regulados por estas secuencias. Este tipo de regulación controla funciones tan diversas como la producción de antibióticos, la motilidad bacteriana, la formación de agregados celulares o biopelículas, producción de pigmentos, la transferencia conjugativa de plásmidos así como la expresión de numerosos genes implicados en el establecimiento de asociaciones con hospedadores eucariotas (Miller & Bassler, 2001).

INTRODUCCIÓN

En *Rhizobium* se ha demostrado la existencia de regulación por QS, habiéndose identificado varias AHLs, así como compuestos de naturaleza química muy distinta como es el caso de la bradyoxetina de *B. japonicum* (Figura Int.5.) (González & Marketon, 2003; He & Fuqua, 2006). La regulación por QS en *Rhizobium* se ha ligado a fenómenos como crecimiento bacteriano, regulación de la transferencia de plásmidos simbióticos, expresión de genes *nod*, producción de EPS, motilidad, eficiencia de nodulación, desarrollo del simbiosoma, así como la fijación de N, fenómenos todos ellos importantes en el establecimiento de la simbiosis.

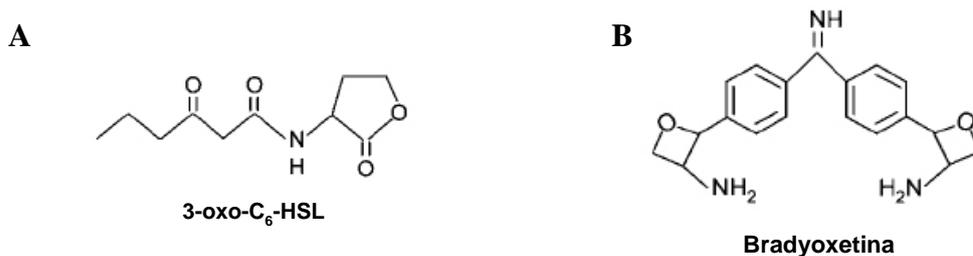


Figura Int.5. Estructura de autoinductores presentes en *Rhizobium*. **A)** Estructura de la 3-oxohexanoilhomoserin lactona (3-oxo-C₆-HSL) de *S. meliloti*. **B)** Estructura del autoinductor no-AHL bradyoxetina, identificada en *B. japonicum*. Tomado de Soto *et al.*, 2006.

Los distintos estudios realizados sugieren que la regulación por QS puede contribuir de varias formas al establecimiento de interacciones compatibles planta-bacteria en general, y de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, en particular (Soto *et al.*, 2006):

1.- Por un lado, la existencia de una regulación por QS en *Rhizobium* facilita la transición del modo de vida saprofítico de la bacteria al de un microorganismo que va a interactuar con la planta. Así, en *S. meliloti* se sabe que el sistema Sin/ExpR es capaz de reprimir fenotipos como la motilidad, importantes para el modo de vida libre, al mismo tiempo que activa la expresión de factores importantes en la colonización e invasión de la planta como los EPS (Hoang *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005).

2.- Controla el desarrollo de biopelículas sobre superficies vegetales, proceso importante en las etapas tempranas de interacción con el hospedador. En *M. huakuii*, la sobre-expresión del regulador TraR de *Agrobacterium*, provoca una reducción en la acumulación de AHL en el sobrenadante y la formación de biopelículas más finas que las desarrolladas por la cepa silvestre (Wang *et al.*, 2004).

3.- Este sistema de regulación controla la expresión de genes que tienen un papel directo en el proceso de infección y desarrollo del nódulo en la leguminosa, como

ha sido demostrado para los genes *nod* de *B. japonicum* (Loh *et al.*, 2002), los genes *rhi* que se expresan en rizosfera e influyen en la nodulación de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Cubo *et al.*, 1992), o los genes implicados en la producción de EPS I y EPS II de *S. meliloti* (Glenn *et al.*, 2007). El control por QS de estos determinantes podría tener dos finalidades no excluyentes entre sí: i) evitar que la producción temprana de factores como el EPS puedan interferir con fenómenos que han de ocurrir previos a la invasión, como es la adhesión. Un hecho que apoya esta hipótesis es que mutantes en QS de *M. tianshanense* muestran defectos en adsorción a distintas superficies (Zheng *et al.*, 2006); ii) Otra posibilidad es que la regulación por QS de estos factores permite no alertar demasiado pronto al vegetal y evitar que las respuestas de defensa aparezcan antes de que la población haya alcanzado una densidad que asegure una infección exitosa.

4.- Función señalizadora en la planta. Mathesius *et al.*, (2003) demostraron que la leguminosa modelo *Medicago truncatula* es capaz de detectar y responder a la adición de AHLs producidas por *Rhizobium* y bacterias patógenas. Aunque muchas de las respuestas detectadas en la planta fueron comunes, también se detectaron cambios específicos influidos por la concentración y estructura de la molécula, sugiriendo que la planta es capaz de discriminar entre AHLs producidas por distintas bacterias. Además de inducir cambios en los niveles de proteína de las raíces, algunas de ellas relacionadas con la respuesta defensiva de la planta, la exposición a AHLs provoca en la planta cambios en la secreción de compuestos que mimetizan las señales QS y que potencialmente podrían interferir (estimulando o bloqueando) en la aparición de fenotipos bacterianos regulados por QS (Bauer & Mathesius, 2004).

3. RESPUESTAS DE DEFENSA IDENTIFICADAS DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Las plantas, como los animales, son capaces de poner en marcha mecanismos de defensa ante el ataque de un microorganismo invasor. En el caso de los vegetales se acepta la existencia de dos sistemas generales de inmunidad. Existe una “inmunidad innata” que se dispara tras la percepción de inductores generales, componentes muy conservados entre los distintos microbios y que son esenciales en su ciclo biológico. Tales componentes microbianos son conocidos como MAMPs (Microorganism-Associated Molecular Patterns), y entre ellos se encuentran la quitina de la pared celular de los hongos, o la flagelina y el LPS de bacterias (Gómez-Gómez & Boller, 2002; Ausubel, 2005). El reconocimiento por la planta de la presencia de

INTRODUCCIÓN

MAMPs conlleva la activación de cascadas de señalización y la puesta en marcha de mecanismos destinados a dificultar la posible invasión del microorganismo. Entre ellos podemos destacar la acumulación de especies reactivas de oxígeno conocida como pulso oxidativo, la expresión de proteínas de defensa, el refuerzo de la pared celular y la producción de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas. Existe un segundo tipo de inmunidad específica de cultivar basada en la existencia en la planta de un gen de resistencia específico (R) capaz de disparar reacciones de defensa frente a patógenos portadores del correspondiente producto de avirulencia (Avr). En este caso, el reconocimiento conlleva una respuesta muy intensa, rápida y localizada conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR), caracterizada por la muerte de las células vegetales en el sitio de entrada del patógeno, y en la que se crea un ambiente desfavorable para el crecimiento y reproducción del patógeno (Dixon & Harrison, 1994).

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la bacteria es capaz de establecer una infección crónica en la planta. Aún hoy se desconocen las bases moleculares por las que la leguminosa tolera la invasión por *Rhizobium*. Se sabe que inductores generales como la flagelina, el factor de elongación (EFTu) o *Cold Shock Proteins* (CSP), también presentes en *Rhizobium*, no desencadenan las respuestas típicas de defensa basal (Boller, 2005). No obstante existen evidencias que demuestran que durante el proceso infectivo, la planta pone en marcha respuestas de defensa. Estas sin embargo, son débiles, localizadas y transitorias en una interacción *Rhizobium*-leguminosa compatible, y en algunos casos son incluso requeridas para el buen desarrollo de la simbiosis. Generalmente, las mismas respuestas pueden llegar a ser muy intensas cuando el *Rhizobium* no es compatible, teniendo en este caso la misma finalidad que cuando se ponen de manifiesto en una interacción planta-patógeno: abortar la infección. Hoy se piensa que el éxito de la interacción simbiótica requiere que las respuestas de defensa inducidas por ciertos efectores rizobianos sean contrarrestadas por otros componentes de la bacteria (Jones *et al.*, 2007a).

A continuación se describen algunas de las respuestas relacionadas con defensa identificadas durante la asociación simbiótica, así como su posible papel en la interacción planta-bacteria (Figura Int.6.).

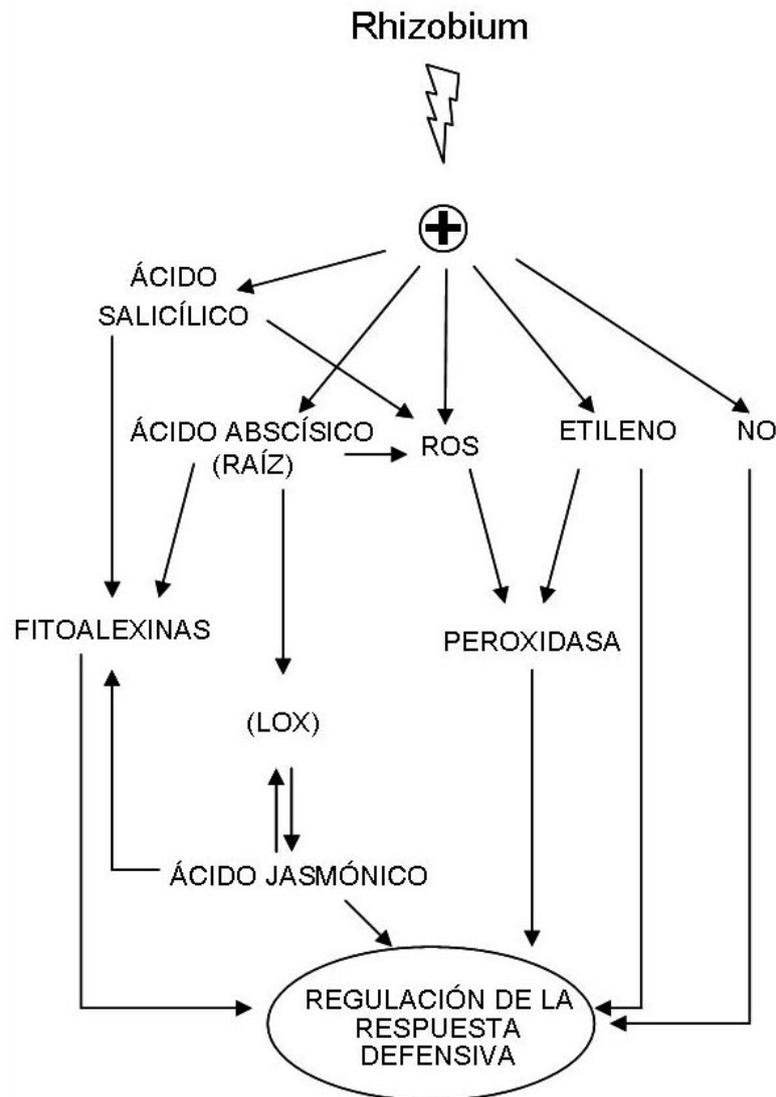


Figura Int.6. Modelo propuesto para la interacción de señales reguladoras de la respuesta defensiva en *Rhizobium*. Adaptado de Ferguson & Mathesius, 2003. LOX, lipooxigenasas; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno.

3.1. Inducción de genes de la ruta fenilpropanoide.

La inducción de esta ruta es un elemento importante en la respuesta defensiva contra patógenos en multitud de especies vegetales. Enzimas de esta ruta como la fenilalanina-amoniio-liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), contribuyen a la síntesis de dos compuestos que participan en la defensa vegetal: fitoalexinas con actividad antimicrobiana y el ácido salicílico (SA). En la simbiosis se ha detectado la acumulación de PAL y CHS en nódulos en desarrollo (Vasse *et al.*, 1993), y la activación de los genes que codifican estas enzimas se ha observado como una respuesta

temprana en raíces y pelos radicales tras la inoculación con *Rhizobium* y factores Nod (Krause *et al.*, 1997). No está claro si la inducción de estas enzimas por *Rhizobium* tiene el objetivo de controlar la infección bacteriana o si por el contrario se requiere para la síntesis de nuevos flavonoides que podrían actuar o bien como inductores de genes *nod*, o bien afectando el transporte polar de auxinas requerido en la morfogénesis del nódulo (Mathesius *et al.*, 1998).

3.2. Acumulación de fitoalexinas.

Constituyen un conjunto de isoflavonoides ausentes en plantas hospedadoras sanas y cuyo aumento está relacionado con la presencia de diversos patógenos vegetales (Halverson & Stacey, 1986). Se ha comprobado que en presencia de *Rhizobium* se acumulan estos compuestos en distintas leguminosas hospedadoras compatibles, aunque en menor cantidad que las concentraciones derivadas de asociaciones patogénicas, lo que señala la presencia de una regulación de los niveles de fitoalexinas durante la simbiosis (Phillips & Kapulnik, 1995). Algunos autores han sugerido que el microsimbionte podría usar precursores de las fitoalexinas, como señales para inducir los genes *nod* (Dakora *et al.*, 1993).

3.3. Respuesta de hipersensibilidad (HR).

La HR es uno de los mecanismos más obvios de defensa vegetal frente a patógenos avirulentos. Se pone de manifiesto con la aparición de manchas necróticas en el sitio en el que el patógeno ha intentado entrar, que se corresponden con células vegetales muertas. Rasgos citológicos y bioquímicos típicos de una HR se han detectado de forma muy localizada acompañando canales de infección abortados en la interacción *S. meliloti* – alfalfa (Vasse *et al.*, 1993). Se piensa que éste es uno de los mecanismos por los que la planta consigue controlar el número de nódulos que va a desarrollar (mecanismo de autorregulación). Muerte celular localizada característica de la HR también se ha detectado durante la colonización intercelular de la base de las raíces laterales en la nodulación de la leguminosa semiacuática *Sesbania rostrata* (D’Haeze *et al.*, 2003). En este caso, la muerte celular, probablemente consecuencia de la acumulación de etileno y ROS disparada por el FN, podría tener la misión de fortalecer el tejido como parte de la respuesta al estrés causado por encharcamiento.

3.4. Producción de ácido salicílico (SA)

El SA es una molécula que desempeña un papel clave en defensa ya que induce la expresión y secreción de proteínas PR (Pathogenesis Related), proteínas que se acumulan en el tejido vegetal muchas de las cuales muestran actividad antifúngica o antimicrobiana (Dong, 1998). Además, el SA genera una señal móvil (metilSA) responsable de la resistencia sistémica adquirida (SAR), un mecanismo que confiere resistencia a largo plazo frente a un amplio espectro de patógenos, en tejidos vegetales que nunca han estado en contacto con el microorganismo invasor.

En la simbiosis se ha detectado la acumulación de SA en las raíces de leguminosas inoculadas con rizobios incompatibles incapaces de sintetizar el factor Nod (Martínez-Abarca *et al.*, 1998), resultados que sugieren que el control de la síntesis de SA por la planta puede ser importante para que se establezca la interacción entre *Rhizobium* y las leguminosas. Existen datos que corroboran esta hipótesis. Así, la adición exógena de SA inhibe la formación de primordios nodulares así como el número final de nódulos y peso seco de la planta (Martínez-Abarca *et al.*, 1998; Ferguson & Mathesius, 2003). Del mismo modo, la reducción de los niveles de SA endógeno en plantas transgénicas *nahG* de *Lotus japonicus* y *M. truncatula*, resulta en un incremento en el número de infecciones así como en el número de nódulos desarrollados (Stacey *et al.*, 2006b).

3.5. Expresión de proteínas relacionadas con patogénesis (PR)

Las PRs constituyen un amplio grupo de proteínas con diversas actividades enzimáticas (glucanasas, quitinasas, peroxidadas, defensinas, ...) que actúan intra- o extracelularmente con la finalidad de dificultar o incluso destruir al agente patógeno. Al igual que ocurre en presencia de patógenos, se ha detectado la presencia de estas proteínas tras la infección de plantas leguminosas con *Rhizobium*. Entre ellas se han identificado quitinasas, peroxidadas y lipooxigenasas (LOX).

La expresión de quitinasas en etapas tempranas del desarrollo del nódulo, se ha relacionado en la simbiosis con un papel en el control de la actividad biológica del factor Nod (Perret *et al.*, 2000). La degradación del factor Nod se cree que es necesaria para suprimir la continua estimulación en la planta así como una respuesta defensiva más exacerbada por parte de ésta a elevadas concentraciones de la señal simbiótica (Stahelin *et al.*, 1995; Goormachtig *et al.*, 1998). La inducción de peroxidadas en respuesta a la aplicación de *Rhizobium* o de FN, sugiere la existencia de un pulso

oxidativo durante la interacción simbiótica (Salzwedel & Dazzo, 1993). Se piensa que estas proteínas podrían tener una doble función generando y utilizando H_2O_2 para llevar a cabo modificaciones de la pared celular, modificaciones que podrían estar relacionadas con una respuesta defensiva, o bien ser necesarias para el correcto desarrollo de los canales de infección. La LOX contribuye de distintas formas a la resistencia vegetal participando en la síntesis de moléculas señales como el ácido jasmónico (JA), o peróxidos lipídicos. Además, se ha relacionado con desarrollo vegetal. Por ello, la detección de actividad LOX en estadíos tempranos y en nódulos de interacciones compatibles *Rhizobium*-leguminosa, sugiere un papel de este enzima bien en el desarrollo del nódulo, o bien en la producción de moléculas señales implicadas en defensa, con las cuales la planta podría controlar el nivel de infección (Bueno *et al.*, 2001).

3.6. Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), conocida también como pulso oxidativo, es una de las respuestas más tempranas de la célula vegetal desencadenada tras el reconocimiento de un microorganismo patógeno (Lamb & Dixon, 1997). Varias son las funciones que se han asignado a las ROS en defensa vegetal: papel antimicrobiano directo sobre el patógeno, promover cambios estructurales de la pared celular con el objetivo de reforzarla, promover la apoptosis o muerte celular programada de la célula que ha sido invadida por el patógeno característica de la respuesta de hipersensibilidad (HR), y actuar como molécula señal que induce la expresión de una serie de genes de defensa.

Existen diversos datos en la literatura que indican que durante la interacción *Rhizobium*-leguminosa, la planta responde con un acúmulo de ROS, fundamentalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido (O_2^-). La función que cumplen estas ROS en el establecimiento de la simbiosis, sin embargo, no está del todo clara. Existen evidencias que sugieren que la producción de un pulso oxidativo moderado y controlado podría ser necesaria para el correcto desarrollo de la simbiosis. Así, en la interacción compatible *M. sativa* - *S. meliloti*, se ha detectado la producción localizada y prolongada de O_2^- y H_2O_2 , en canales de infección y en las células infectadas de nódulos jóvenes y maduros (Santos *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004). De forma similar, se ha detectado un acúmulo de ROS en los bolsillos de infección intercelulares que preceden a la formación de nódulos en el tallo de la leguminosa semiacuática *S. rostrata* (D'Haeze *et*

al., 2003). En este último caso, el H₂O₂ parece ser parte de la cascada de señalización requerida en la formación de los nódulos. La función de molécula señal parece ser también la que ejercen las ROS detectadas en raíces de *M. truncatula* tras la aplicación de los factores Nod, donde la rápida y localizada producción de superóxido va acompañada de la activación de la expresión de una nodulina temprana (Ramu *et al.*, 2002). Otro dato que apoya la idea de que la producción de ROS es importante para el desarrollo de la simbiosis se ha obtenido con mutantes de *S. meliloti* que sobreexpresan la catalasa KatB, los cuales muestran un retraso en su capacidad para nodular la leguminosa (Pauly *et al.*, 2006). Las ROS originadas tras el reconocimiento de *Rhizobium* podrían participar en el correcto desarrollo de la simbiosis bien actuando como moléculas señales que activan la expresión de genes simbióticos, y/o promoviendo ciertos cambios estructurales. La segunda posibilidad ha sido sugerida en guisante donde la producción de H₂O₂ parece ser necesaria para la modificación de la matriz glicoproteica de los canales de infección (Wisniewski *et al.*, 2000).

En otras situaciones, en cambio, la producción de ROS asociada a la interacción *Rhizobium*-leguminosa parece tener fundamentalmente un papel defensivo, controlando la infección de la bacteria. Un ejemplo de este tipo de función sería la desempeñada por las ROS producidas en la HR asociada a células vegetales en las que se produce el aborto de algunos canales de infección (Vasse *et al.*, 1993; Hérouart *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la puesta en marcha de una HR (probablemente disparada por la producción de ROS) es uno de los mecanismos por los que la planta controla la infección rizobiana y regula el número de nódulos que va a desarrollar (mecanismo de autorregulación). También parece tener una función claramente defensiva, el intenso pulso oxidativo detectado en raíces de alfalfa inoculadas con un *Rhizobium* incompatible (Bueno *et al.*, 2001). Un efecto negativo adicional de las ROS en el desarrollo de la simbiosis ha sido recientemente descrito por Lohar *et al.*, (2007), quienes han demostrado que la aplicación exógena de ROS bloquea la deformación de pelos radicales inducida por los factores Nod de *Rhizobium*.

3.7. Producción de óxido nítrico (NO)

El NO es un compuesto producido rápidamente por las plantas tras el reconocimiento de un patógeno avirulento, gracias a la actuación de una óxido nítrico sintasa (NOS). El NO dispara la muerte celular característica de la HR, activa la expresión de numerosos genes relacionados con defensa, contribuye a incrementar los

niveles de ROS en la célula, y modula la síntesis de compuestos implicados en defensa como el etileno (ET), jasmónico (JA) y SA (Durner & Klessig, 1999). En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se ha detectado la producción de NO en las células que contienen bacteroides de nódulos funcionales de *M. truncatula*, lo que ha llevado a sugerir una nueva función para esta molécula no relacionada con defensa (Baudouin *et al.*, 2006). Más recientemente se ha implicado al NO en el control de la formación de nódulos de tipo indeterminado (Pii *et al.*, 2007).

3.8. Producción de etileno (ET)

El ET, producido de forma rápida por plantas atacadas por patógenos, se ha implicado en dos mecanismos de defensa independientes del SA: i) producción de proteínas tóxicas (defensinas y tioninas) en respuesta a la infección fundamentalmente por patógenos necrotrofos y ii) resistencia sistémica inducida (ISR), un estado de defensa disparado por bacterias no patógenas que colonizan las raíces.

Se sabe que la inoculación con *Rhizobium* dispara los niveles de ET producidos por la leguminosa (Ligero *et al.*, 1986; Suganuma *et al.*, 1995). Experimentos farmacológicos y el uso de leguminosas con sensibilidad alterada al ET claramente demuestran que esta fitohormona es un inhibidor de la nodulación (Lee & LaRue, 1992; Penmetsa & Cook, 1997). Se ha demostrado que el ET es capaz de inhibir muchas de las respuestas disparadas por el FN (Oldroyd *et al.*, 2001). No obstante, aparte de su papel como inhibidor de la nodulación, al ET se le han atribuido funciones adicionales en el establecimiento de la simbiosis mutualista (D'Haeze *et al.*, 2003). Entre ellas: determinar la posición de los primordios nodulares en la raíz (Heidstra *et al.*, 1997) conferir plasticidad fenotípica en el desarrollo de los nódulos de *S. rostrata* (Fernández-López *et al.*, 1998), o ser una molécula esencial en el inicio del desarrollo del nódulo y la colonización intercelular bacteriana del córtex en la base de las raíces laterales de *Sesbania* (D'Haeze *et al.*, 2003).

4. CONTROL DE LA RESPUESTA DEFENSIVA POR *Rhizobium*

Como se ha comentado en el apartado anterior, incluso en una interacción *Rhizobium*-leguminosa compatible, la planta pone en marcha respuestas de defensa pero éstas son normalmente débiles, locales o transitorias. El hecho de que existan mutantes tanto de la bacteria como de la planta, incapaces de establecer simbiosis eficientes y en las que se disparan respuestas de defensa mucho más intensas, sugiere que el éxito de la

asociación requiere un control de la defensa vegetal en el que participan tanto componentes de la bacteria como de la planta (Niehaus *et al.*, 1993; Perotto *et al.*, 1994; Kuppusamy *et al.*, 2004; Veereshlingam *et al.*, 2004). Aunque aún no existe una caracterización detallada de genes vegetales implicados en la supresión de respuesta defensiva durante la interacción con *Rhizobium*, existen evidencias que sugieren que dichos genes codifican reguladores negativos de la respuesta inmune que actúan en distintas etapas de la interacción.

Sí se tiene más información sobre componentes bacterianos implicados en bloquear o superar la respuesta defensiva de la planta. Entre ellos destacan: el factor Nod, polisacáridos superficiales, inhibidores de la síntesis de ET, sistemas antioxidantes, y genes de virulencia. Con la excepción del FN que es una estrategia exclusiva de *Rhizobium*, el resto de los componentes son también utilizados por diversas bacterias patógenas para controlar la respuesta inmune del vegetal (Soto *et al.*, 2006). Las características de genes de *Rhizobium* homólogos a genes de virulencia de bacterias patógenas, y cómo contribuyen al control de la respuesta defensiva, se describirán en la siguiente sección de este capítulo de Introducción.

a) Factor Nod

Además de su función específica en la organogénesis del nódulo e inicio del proceso de infección, existen evidencias que apoyan el papel del FN en el control de la respuesta defensiva de la leguminosa. Así, mutantes de *S. meliloti* incapaces de sintetizar FN, inducen en raíces de alfalfa un mayor acúmulo de SA y H₂O₂, que la cepa productora de FN (Martínez-Abarca *et al.*, 1998; Bueno *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la adición de FN purificado a raíces de *M. truncatula*, es capaz de suprimir la actividad generadora de ROS (Shaw & Long, 2003).

b) Polisacáridos superficiales (SPS)

En la sección 2.2 se ha discutido el posible papel de los SPS en la simbiosis, donde también se ha mencionado su posible papel en control de la respuesta defensiva durante la interacción planta-bacteria. Resumiendo, existen evidencias de que al menos 3 tipos de SPS rizobianos participan en el control de la respuesta defensiva de la planta, bien actuando como molécula señal capaz de suprimir la puesta en marcha de la respuesta inmune, bien como escudo protector de la bacteria. Entre las evidencias que apoyan la primera posibilidad está la demostración de que la adición de fracciones purificadas de la forma de bajo peso molecular del EPS I de *S. meliloti*, glucanos cíclicos de *Bradyrhizobium*, LPS o sólo el lípido A del LPS de *S. meliloti* consiguen

suprimir respuestas de defensa inducidas por elicitores de patógenos en plantas hospedadoras (Niehaus *et al.*, 1997; Mithöfer *et al.*, 1996; Albus *et al.*, 2001; Scheidle *et al.*, 2005; Tellström *et al.*, 2007). Esta podría ser sin embargo, una función restringida sólo a los hospedadores compatibles, ya que se ha visto que contrariamente a lo observado en *M. sativa* o *M. truncatula*, la adición de LPS de *S. meliloti* a un cultivo celular de tabaco, induce respuesta defensiva (Scheidle *et al.*, 2005). Más recientemente, en un estudio transcriptómico realizado en *M. truncatula* se ha podido comprobar cómo la inoculación con un mutante que carece de EPS I induce en la planta la expresión de un gran número de genes relacionados con defensa (Jones *et al.*, 2008).

La función de los SPS como escudo protector de la bacteria, protegiéndola del efecto nocivo de compuestos antimicrobianos producidos por la planta se ha demostrado para los glucanos cíclicos de *Bradyrhizobium* (Mithöfer *et al.*, 2001), y los EPS de *A. caulinodans* (D’Haeze *et al.*, 2004).

c) Inhibidores de la síntesis de ET

Los rizobios han desarrollado dos tipos de estrategias encaminadas a limitar la síntesis de esta fitohormona en respuesta a la infección bacteriana (Ma *et al.*, 2002). Así, *B. elkanii* produce rizobitoxina [ácido 2-amino-4-(2-amino-3-hidropropoxi)-trans-but-3-enoico], un inhibidor de la síntesis de ET, mientras otras cepas de rizobios producen el enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, la cual degrada el precursor inmediato del ET. Ambas estrategias permiten a los rizobios desarrollar mejores eficiencias de nodulación.

d) Sistemas antioxidantes

Al igual que ocurre en otras bacterias, *Rhizobium* es capaz de sintetizar una serie de sistemas antioxidantes necesarios para la adaptación a condiciones de estrés. La versatilidad de estos sistemas se piensa que ofrece una defensa a la bacteria frente a la acumulación de especies reactivas de oxígeno originadas en la respuesta defensiva de la planta (Pauly *et al.*, 2006). Estos sistemas incluyen diversas actividades enzimáticas como catalasas, superóxido dismutasas, peroxidasas, así como otros sistemas no enzimáticos (glutathione), que resultan importantes tanto en el desarrollo como en el funcionamiento de la simbiosis. Mutantes de *S. meliloti* afectados en la actividad superóxido dismutasa citoplasmática (SODA) inducen menor número de nódulos, y tienen problemas en la diferenciación a bacteroide (Santos *et al.*, 2000). *S. meliloti* dispone además de 3 catalasas que catalizan la degradación de H₂O₂ y que se expresan de forma diferencial durante la formación del nódulo. Dobles mutantes katB/katC y

katA/katC se hallan severamente afectados en nodulación y fijación de nitrógeno (Sigaud *et al.*, 1999). Otros antioxidantes no enzimáticos como el tripéptido glutation también han demostrado ser esenciales en el buen desarrollo de la simbiosis (Harrison *et al.*, 2005).

5. GENES DE VIRULENCIA DE PATÓGENOS PRESENTES EN *Rhizobium*

Con la secuenciación de los genomas de diversas especies de *Rhizobium* se ha podido constatar la presencia en estas bacterias de genes con una elevada homología a determinantes genéticos esenciales en la virulencia de patógenos (Van Sluys *et al.*, 2002). La caracterización de algunos de estos genes ha permitido comprobar que éstos también juegan en muchos casos un papel en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. A continuación se describen algunos de los más relevantes.

5.1.- BacA

El gen *bacA* ha sido caracterizado en *S. meliloti* y en el patógeno de mamíferos *Brucella abortus*. Ambas bacterias requieren la proteína BacA para poder establecer infecciones intracelulares crónicas en sus correspondientes hospedadores (LeVier *et al.*, 2000). Mientras en *Brucella* la ausencia de la proteína BacA dificulta la supervivencia de la bacteria en el interior de los macrófagos, mutantes *bacA* de *S. meliloti* son incapaces de diferenciarse en bacteroides ya que las bacterias se lisan tras ser liberadas desde el canal de infección al citoplasma de la célula vegetal. Aunque se ha barajado la posibilidad de que BacA sea importante para superar la respuesta defensiva del hospedador, lo cierto es que todavía se desconoce su papel exacto en la interacción bacteria-hospedador. Su homología con proteínas eucariotas de membranas de peroxisomas implicadas en el transporte de ácidos grasos, junto con la sensibilidad de los mutantes *bacA* a detergentes y diversos agentes que alteran la envoltura celular, llevó a descubrir que BacA afecta al contenido de ácidos grasos del LPS, participando en la modificación del lípido A con ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) (Ferguson *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la ausencia de BacA podría desencadenar la aparición de un LPS más fácilmente reconocible por el sistema defensivo del hospedador. Sin embargo en un estudio posterior se demostró que la modificación del lípido A de *S. meliloti* y *Brucella* con VLCFA, es importante pero no crucial en la infección, sugiriendo por tanto una función adicional a la proteína BacA que es la que le confiere su esencialidad en el proceso infectivo (Ferguson *et al.*, 2005).

5.2.- Sistemas reguladores de dos componentes (2-CRS)

Constituidos por un sensor con actividad quinasa localizado en la membrana y un activador transcripcional citoplasmático, estos sistemas permiten a las bacterias regular la expresión génica en respuesta a cambios en el entorno, permitiendo así que puedan adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones. Numerosas publicaciones han puesto de manifiesto además su función como reguladores del grado de establecimiento y desarrollo de la infección en bacterias patógenas (Beier & Gross, 2006).

Se han identificado en *Rhizobium* 2-CRS idénticos a los de algunas bacterias fitopatógenas que han resultado tener un importante papel en la simbiosis. Es el caso del sistema ExoS/ChvI de *S. meliloti* ortólogo del sistema ChvG/ChvI de *A. tumefaciens* (Cheng & Walker, 1998). Este sistema muestra además una elevada homología con el sistema BvrS/BvrR del patógeno de animales *B. abortus*, implicado en la invasión y mantenimiento intracelular del patógeno (Sola-Landa *et al.*, 1998). En *A. tumefaciens* mutaciones en cualquiera de los dos elementos del sistema conlleva alteraciones en las propiedades de superficie y anula la capacidad de la bacteria para formar tumores en la planta (Charles & Nester, 1993). Se ha propuesto que ChvG es un sensor general de bajo pH que controla la expresión de genes inducibles por acidez (Li *et al.*, 2002). La señal ambiental detectada por ExoS en *S. meliloti* no se conoce, pero sí se sabe que tanto ExoS como ChvI participan en la regulación de la síntesis de dos componentes de superficie: el EPS I y los flagelos (Yao *et al.*, 2004). Un mutante *exoS* de *S. meliloti* que superproduce EPS I y es aflagelado, está severamente afectado en la colonización de pelos radicales de alfalfa.

Un nuevo ejemplo de 2-CRS compartido con fitopatógenos es el sistema VirA/VirG de *M. loti* R7A (Hubber *et al.*, 2004), cuyo homólogo en *A. tumefaciens* está implicado en la expresión de los genes *vir* esenciales para la transferencia del ADN-T a la planta, en respuesta a compuestos fenólicos procedentes de células vegetales heridas (Winans, 1992). Mutaciones en el sistema VirA/VirG de *Agrobacterium*, convierten a la bacteria en avirulenta. En *M. loti* R7A VirA/VirG actúan como componentes de la cascada reguladora para la expresión de un sistema de secreción tipo IV muy parecido al codificado por el sistema VirB de *Agrobacterium*, en la que participan compuestos exudados por la leguminosa (Hubber *et al.*, 2007). Mutaciones en cualquiera de estos dos componentes de *M. loti* dan lugar a fenotipos simbióticos similares a los obtenidos con mutantes afectados en el sistema VirB, esto es, reducida eficiencia en la formación

de nódulos en plantas hospedadoras o formación de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas no hospedadoras.

5.3.- Sistemas de secreción tipo III (T3SS)

El T3SS es un elemento clave en las asociaciones patogénicas de gran cantidad de bacterias Gram-negativas tanto en animales como en plantas (Galán & Collmer, 1999; Mota *et al.*, 2005). Este sistema de secreción constituido por más de 20 proteínas está codificado por los genes *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity). En bacterias fitopatógenas los T3SS son esenciales para el desarrollo de enfermedad en plantas hospedadoras susceptibles así como para la inducción de una respuesta de hipersensibilidad (HR) en plantas resistentes. Su expresión ocurre en respuesta a factores ambientales que normalmente corresponden al microambiente que la bacteria encuentra durante la infección del hospedador (Hueck, 1998). El T3SS actúa como una especie de jeringuilla que tras contactar con la célula hospedadora, inyecta efectores proteicos directamente al interior de la célula. Estas proteínas translocadas actúan en plantas susceptibles facilitando la entrada, el desarrollo de la infección bacteriana así como regulando la respuesta defensiva del hospedador (Mudgett, 2005). En plantas resistentes las proteínas son reconocidas como factores de avirulencia y desencadenan una respuesta inmune.

En muchos rizobios se han identificado genes que codifican T3SS denominados “*rhc*” (*rhizobial conserved*), normalmente asociados a genes simbióticos en plásmidos o en islas simbióticas del cromosoma (Marie *et al.*, 2001; Bartsev *et al.*, 2004). La expresión de estos genes, al igual que en fitopatógenos, no es constitutiva sino que está bajo el control de ciertas señales procedentes de la planta, similares a las que inducen los genes de nodulación. Del conjunto de sistemas descritos, el T3SS de *Rhizobium* sp. NGR234 es el mejor caracterizado (Marie *et al.*, 2001) (Figura Int.7.). En éste, la expresión génica se encuentra regulada por flavonoides específicos de la leguminosa hospedadora que tras ser reconocidos por la proteína NodD, activan la expresión del regulador transcripcional TtsI el cual a su vez induce la expresión de los genes del T3SS (Marie *et al.*, 2004). Las proteínas secretadas por estos sistemas en *Rhizobium* se conocen como Nops, y a ellas nos hemos referido en el apartado 2.3. de este capítulo. Como en fitopatógenos, el T3SS de los rizobios contribuye a determinar el rango de hospedador. El bloqueo de la secreción proteica por este sistema puede tener diversos efectos en la interacción con la leguminosa, dependiendo de cuál sea la planta

INTRODUCCIÓN

hospedadora. Dichos efectos pueden ir desde no observarse diferencias en presencia/ausencia del T3SS, conseguir la mejora de la nodulación y fijación de nitrógeno o todo lo contrario.

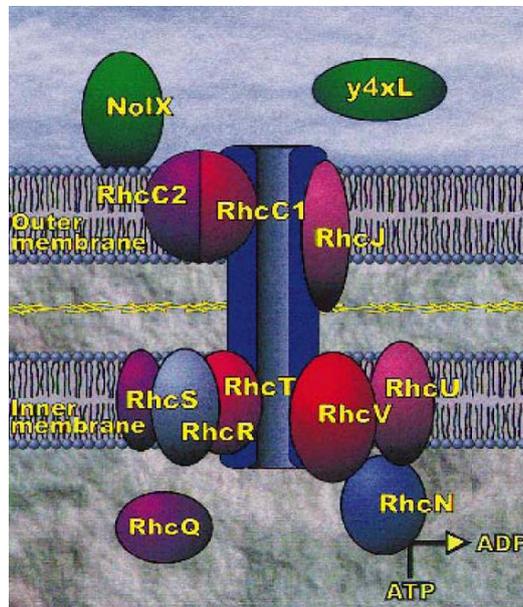


Figura Int.7. Estructura hipotética del T3SS de *R. sp.* NGR234 descrito por Viprey *et al.*, 1998.

5.4.- Sistemas de secreción tipo IV (T4SS)

Agrupan a un conjunto de sistemas de secreción relacionados ancestralmente con el sistema de conjugación bacteriano, que transporta proteínas y complejos de ADN-proteínas entre diferentes organismos del mismo reino (bacteria-bacteria) o de diferentes reinos (bacteria-hongos, bacteria-células vegetales y bacteria-células de mamíferos) (Backert & Meyer, 2006) (Figura Int.8.). Estos sistemas de secreción se han implicado tradicionalmente con la virulencia de bacterias patógenas de animales y vegetales, aunque diversos ejemplos de este tipo de sistemas también han sido relacionados con funciones relativas a la conjugación bacteriana y con la captación o secreción de ADN. Su papel abarca también la implicación en relaciones no patogénicas, mediando el establecimiento y la supervivencia intracelular de simbiontes tales como *Wolbachia* en artrópodos (Masui *et al.*, 2000) o *M. loti* R7A (Hubber *et al.*, 2004). En *M. loti* R7A este sistema que es altamente homólogo al prototipo de los T4SS, el sistema VirB/D4 de *Agrobacterium*, interviene en la secreción de dos efectores, Msi059 y Msi061 (ver apartado 2.3.). Mutantes *virB* de *M. loti* R7A presentan

un comportamiento simbiótico diferente en función de la planta hospedadora. Estos datos sugieren que el sistema VirB y los posibles efectores transportados a través de él modulan el desarrollo de la simbiosis de forma similar a como ocurre con los efectores del T3SS de otros rizobios, y que quizás T3SS y T4SS puedan ser funcionalmente intercambiables. En la secuenciación del genoma de diversas bacterias del orden *Rhizobiales* así como de sus plásmidos simbióticos (González *et al.*, 2003; Bittinger *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001; Freiberg *et al.*, 1997), se han encontrado secuencias que parecen codificar hipotéticos sistemas de secreción tipo IV. Algunos de ellos, concretamente los de *R. etli* y *S. meliloti*, podrían estar implicados en transferencia conjugativa (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005), aunque no se descarta su participación en la interacción con la leguminosa.

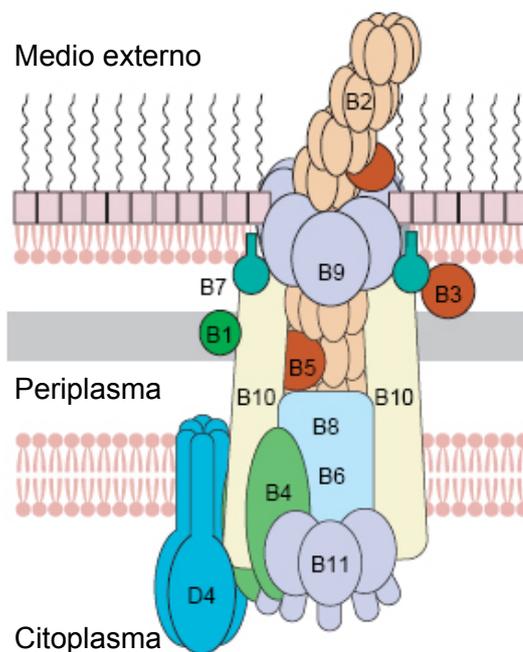


Figura Int.8. Estructura hipotética del sistema de secreción tipo IV de *A. tumefaciens*. Modelo adaptado de Li *et al.*, 2002.

5.5.- FadD

En la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* el gen *rpfB* (*regulation of pathogenicity factors*) participa junto con otros genes *rpf* en el control de la síntesis de factores de patogenicidad entre los que se encuentran enzimas extracelulares y polisacáridos. Mutaciones en los genes *rpf*, conducen a una disminución en la producción de enzimas y polisacáridos y reducen la virulencia de la bacteria. RpfB es una proteína FadD, una acil-CoA sintetasa específica de ácidos grasos de cadena larga, que junto con RpfF (enoil-CoA hidratasa) participa en la síntesis de una molécula señal

difusible (DSF) responsable en último término de regular la expresión de los factores de patogenicidad (Barber *et al.*, 1997). DSF ha sido estructuralmente caracterizado como ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico, un ácido graso α,β insaturado muy relacionado con el ácido farsenoico capaz de regular no sólo genes de virulencia sino también una gran variedad de genes que contribuyen al buen estado del patógeno en diversos ecosistemas (Wang *et al.*, 2004). Homólogos al gen *rpfB* se han encontrado también en otros patógenos vegetales como es el caso de *Xyllela fastidiosa* (Meinhardt *et al.*, 2003). Además, en *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium, la ausencia de un homólogo a *fadD* reprime la expresión de *hilA*, un activador transcripcional de los genes de invasión de la bacteria (Lucas *et al.*, 2000).

Curiosamente el gen *fadD* también parece ser un componente importante para el establecimiento de relaciones simbióticas mutualistas con leguminosas. Así, un mutante *fadD* de *S. meliloti* se encuentra afectado en su capacidad infectiva y competitiva por la nodulación en plantas de alfalfa (Soto *et al.*, 2002). La ausencia de FadD en *S. meliloti* además promueve swarming condicional, un tipo de movimiento multicelular muy relacionado con patogénesis, y afecta la expresión de ciertos genes entre los que se encuentra *nodC*. Todo esto ha llevado a proponer que en *S. meliloti*, en respuesta a condiciones fisiológicas y/o medioambientales, un compuesto relacionado con la actividad FadD podría actuar como señal que participa en el control coordinado de motilidad y expresión de genes simbióticos.

OBJETIVOS

La simbiosis mutualista *Rhizobium*-leguminosa se caracteriza por la aparición en la planta de un nuevo órgano, el nódulo, en cuyo interior una forma especializada y diferenciada de la bacteria, el bacteroide, es capaz de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno. La formación de un nódulo fijador es un proceso altamente específico y complejo que requiere de un continuo y adecuado diálogo molecular entre los dos simbioses. En este proceso la bacteria es capaz de establecer una infección crónica en la planta, eludiendo la respuesta inmune del hospedador.

Existen evidencias de que *Rhizobium* y bacterias fitopatógenas han adoptado estrategias similares que les permiten colonizar, invadir y establecer una infección crónica en la planta (Soto *et al.*, 2006). Genes de virulencia típicos de bacterias patógenas parecen tener un papel relevante en el control de la respuesta defensiva del hospedador. Curiosamente, algunos de estos genes, entre los que se encuentran los sistemas de secreción tipo III, también han sido identificados en *Rhizobium* y parecen ser importantes en el establecimiento de la simbiosis.

El gen *fadD* de *Sinorhizobium meliloti*, en cuya caracterización ha participado el grupo de Interacciones Planta-Bacteria de la EEZ, es otro ejemplo de determinante genético que además de mostrar homología con genes de virulencia de bacterias patógenas, desempeña una función en la interacción *Rhizobium*-leguminosa (Soto *et al.*, 2002). En el patógeno *Xanthomonas campestris*, el gen *rpfB*, un homólogo a *fadD*, forma parte de un conjunto de genes que participan en la regulación de factores de patogenicidad. Por otra parte, la disponibilidad de la secuencia de los genomas de diversos rizobios, entre ellos la bacteria de estudio en este trabajo *S. meliloti*, ha puesto de manifiesto la presencia de numerosos genes homólogos a genes de virulencia de bacterias que establecen asociaciones patogénicas.

Con el objetivo general de investigar el papel que pueden tener en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, genes relacionados con virulencia que se encuentran presentes en *S. meliloti*, se han abordado los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización de la región adyacente al gen *fadD* de *S. meliloti*
2. Caracterización de un sistema de secreción tipo IV presente en el plásmido pSymA de *S. meliloti*

MATERIAL Y MÉTODOS

1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

1.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas de *E. coli*, *A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *R. etli*, *Rhizobium sp.*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *M. ciceri* así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las tablas MyM.1 y MyM.2, respectivamente.

Tabla MyM.1. Cepas utilizadas en este trabajo.

CEPA	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIAS
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>f80</i> , <i>lacZ</i> Δ M, <i>5hsdR171</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Research Laboratory [®]
ER2566	Deficiente en proteasas [<i>lon</i>] <i>ompT</i> . Contiene la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor <i>lac</i> (<i>lacZ::T7</i>)	New England Biolabs [®]
KK52	Derivada de PP6, <i>pgi::Tn5</i> ; Km ^R	(Kimata <i>et al.</i> , 2001)
PP6	Cepa silvestre	(Kimata <i>et al.</i> , 1998)
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4Tc:: <i>Mu</i> , Km:: <i>Tn7</i> ; Tp ^R , Sm ^R , Spc ^R	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>A. tumefaciens</i>		
GMI9023	Derivada de C58 curada de sus plásmidos nativos; Sm ^R , Rif ^R	(Rosenberg & Huguet, 1984)
LBA1010	Derivada de LBA288 conteniendo el plásmido pTiB6; Rif ^R , Nal ^R	(Koekman <i>et al.</i> , 1982)
LBA1512 LBA1516	Derivadas de LBA288 conteniendo pTiB6:: <i>tn1831</i> ; VirB ⁻ ; Rif ^R Spc ^R	(Hooykaas <i>et al.</i> , 1984)

MATERIAL Y MÉTODOS

<i>S. meliloti</i>		
1021	Derivada de 2011, cepa silvestre, Nod ⁺ , Fix ⁺ ; Sm ^R	(Meade <i>et al.</i> , 1982)
1021fliF	Derivada de 1021 (Δ fliF)	María José Soto (EEZ)
100tSS	Derivada de 1021 (Δ otsA::SmSpc); Sm ^R , Spc ^R	Ana Domínguez Ferreras (EEZ)
1021pgi	Derivada de 1021 (Δ SMc02163::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
1021rctA	Derivada de 1021 (Δ rctA::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2005)
1021rctAvirB	Derivada de 1021 (Δ rctA::Sm/Spc Δ virB::Km); Sm ^R , Spc ^R , Km ^R	Este trabajo
1021virB	Derivada de 1021 (Δ virB::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
1021virBfliF	Derivada de 1021virB (Δ fliF)	María José Soto (EEZ)
Rm H4a	Derivada de 2011 con una inserción <i>exoA::lacZ-Gm</i> ; Gm ^R	(Becker <i>et al.</i> , 1993)
GR4	Cepa silvestre, Nod ⁺ , Fix ⁺	(Casadesús & Olivares, 1979)
GR4rctA	Derivada de GR4 (Δ rctA::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	D. Pérez Mendoza (EEZ)
GR4rctAvirB	Derivada de GR4 (Δ rctA::Sm/Spc Δ virB::Km); Sm ^R , Spc ^R , Km ^R	Este trabajo
GR4virB	Derivada de GR4 (Δ virB::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
<i>Rhizobium sp.</i>		
NGR234	Aislado de nódulos de <i>Lablab purpureus</i> de amplio rango de hospedador; Rif ^R	(Stanley <i>et al.</i> , 1988)
<i>Mesorhizobium ciceri</i>		

IC 2091	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	(Nour <i>et al.</i> , 1995)
<i>R. etli</i>		
CE3	Derivada Sm ^R de la cepa silvestre CFN42	(Quinto <i>et al.</i> , 1985)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>		
UPM791	128C53, Nod ⁺ , Fix ⁺ , Hup ⁺ , Sm ^R	(Ruíz Argüeso <i>et al.</i> , 1978)

Tabla MyM.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIAS
p53otsA	Derivado de p53Gus portador de la fusión transcripcional <i>otsA::uidA</i> de <i>S. meliloti</i>	Domínguez-Ferreras, 2007
pBluescript II KS	Vector de clonación; Ap ^R	Stratagene [®]
pBRPF1	Derivado de pBluescript II KS conteniendo un fragmento <i>Bam</i> HI de 7,13 Kb del cósmido pRmerpf238; Ap ^R	María José Soto (EEZ)
pBVIR2	Derivado de pBluescript II KS conteniendo un fragmento amplificado de 0,960 Kb correspondiente al extremo 5' de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> 1021; Ap ^R	Este trabajo
pBVIR200	Derivado de pBVIR2 conteniendo el inserto de pGVIR4; Ap ^R	Este trabajo
pBVIR300	Derivado de pBVIR200 conteniendo el casete de resistencia Sm/Spc de pHP45Ω clonado en el único sitio <i>Hind</i> III; Sm ^R , Spc ^R , Ap ^R	Este trabajo
pBVIR500	Derivado de pBVIR200 conteniendo el casete de resistencia Km de pHP45Ω-Km clonado en el único sitio <i>Hind</i> III; Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pBvirB5	Derivado de pBluescript II KS conteniendo un fragmento de 1,06 Kb que porta el gen <i>virB5</i>	Este trabajo

MATERIAL Y MÉTODOS

	de <i>S. meliloti</i> 1021, Ap ^R	
pERP10	Derivado de pBluescript II KS conteniendo un fragmento <i>EcoRI</i> de 1,4 Kb de pRmerpf238 en el que se localiza el extremo 3' del gen <i>fadD</i> y 5' de SMc02163 de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	María José Soto (EEZ)
pGD499	Derivado de pRK290 conteniendo una fusión <i>npt::lacZ</i> , Tc ^R	(Ditta <i>et al.</i> , 1985)
pGEM [®] -T Easy	Vector de clonación para fragmentos de PCR, Ap ^R	Promega [®]
pGUS3	Derivado de pBI101 (Clontech) conteniendo la fusión transcripcional <i>nfe::gusA</i> , Km ^R	(García-Rodríguez & Toro, 2000)
pGVIR2	Derivado de pGEM [®] -T Easy conteniendo un fragmento amplificado de 378 pb que porta los extremos 5' de los genes <i>rctA</i> y SMa1322 de <i>S. meliloti</i> 1021; Ap ^R	Este trabajo
pGVIR3	Derivado de pGEM [®] -T Easy conteniendo un fragmento amplificado de 872 pb que porta los extremos 5' de los genes <i>rctA</i> , <i>virB1</i> y el gen SMa1322 de <i>S. meliloti</i> 1021; Ap ^R	Este trabajo
pGVIR4	Derivado de pGEM [®] -T Easy conteniendo un fragmento amplificado de 1,130 Kb correspondiente al extremo 3' de la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> 1021; Ap ^R	Este trabajo
pGVIR5	Derivado de pGEM [®] -T Easy conteniendo un fragmento amplificado de 1,23 Kb que porta íntegro el gen <i>rctA</i> y el inicio del gen <i>virB1</i> de <i>S. meliloti</i> 1021; Ap ^R	Este trabajo
pHP45Ω	Plásmido portador del casete Sm/Spc; Ap ^R , Sm ^R , Spc ^R	(Prentki & Krisch, 1984)
pHP45Ω-Km	Plásmido portador del casete Km; Ap ^R , Km ^R	(Fellay <i>et al.</i> , 1987)
pK18 <i>mobsacB</i>	Vector suicida, Mob ⁺ , Km ^R , <i>sacB</i>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pKES5	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo un fragmento <i>EcoRI</i> – <i>SalI</i> de 0,6 Kb de la región	Este trabajo

	central del gen SMc02163; Km ^R	
pKVIR400	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo la versión mutada de la región <i>virB</i> del plásmido pBVIR300; Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pKVIR600	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo la versión mutada de la región <i>virB</i> del plásmido pBVIR500; Km ^R	Este trabajo
pLAFR1	Cósmido IncP; Tc ^R	(Friedman <i>et al.</i> , 1982)
pML122	Derivado del plásmido IncQ RSF1010; Gm ^R Km ^R	(Labes <i>et al.</i> , 1990)
pMP220	Vector IncP de amplio rango de hospedador. Permite fusiones transcripcionales a <i>lacZ</i> ; Tc ^R	(Spaink <i>et al.</i> , 1987)
pMPPGI	Derivado de pMP220 que contiene una fusión SMc02163:: <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pMPVIR1011	Derivado de pMP220 que contiene una fusión <i>rctA</i> -SMa1322:: <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pMPVIR2011	Derivado de pMP220 que contiene una fusión SMa1322:: <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pMPVIR3011	Derivado de pMP220 que contiene una fusión SMa1322- <i>virB1</i> :: <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pMPVIR4011	Derivado de pMP220 que contiene una fusión <i>rctA</i> -SMa1322- <i>virB1</i> :: <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pPGI4	Derivado de pGEM [®] T-Easy conteniendo un fragmento amplificado <i>XbaI</i> – <i>KpnI</i> de 1,64 Kb del gen SMc02163 de <i>S. meliloti</i> 1021; Ap ^R	Este trabajo
pPGI40	Derivado de pBluescript II KS que contiene el inserto de pPGI4 clonado en <i>SmaI</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pPGI50	Derivado de pBluescript II KS idéntico a pPGI40 pero con el inserto clonado en orientación contraria; Ap ^R	Este trabajo
pPGI400	Derivado de pTE3 conteniendo el gen SMc02163 en sentido contrario al promotor <i>trp</i> ; Tc ^R	Este trabajo

MATERIAL Y MÉTODOS

pPGI500	Derivado de pTE3 conteniendo el gen SMc02163 bajo control del promotor <i>trp</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pPGI6	Derivado de pGEM [®] -T Easy conteniendo un amplificado de 1,62 Kb del gen SMc02163 de <i>S. meliloti</i> 1021; Ap ^R	Este trabajo
pRK2013	Plásmido movilizador derivado de RK2; Km ^R	(Figurski & Helinski, 1979)
pRmerpf238	Cósmido derivado de pLAFR1 conteniendo la región <i>fadD</i> de <i>S. meliloti</i> GR4; Tc ^R	(Soto <i>et al.</i> , 2002)
pRmM57	Derivado de pLAFR1 conteniendo una fusión <i>nodC::lacZ</i> , Tc ^R	(Mulligan & Long, 1985)
pRU2311	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo una versión delecionada del gen <i>fliF</i> de <i>S. meliloti</i> ; Km ^R	B. Scharf (U. Regensburg) (Alemania)
pSmeVIRB1.1 pSmeVIRB2.2	Cósmidos derivados de pLAFR1 que portan la región <i>virB</i> completa de <i>S. meliloti</i> GR4; Tc ^R	Este trabajo
pSmeVIRB1.2	Cósmido derivado de pLAFR1 que porta parcialmente la región <i>virB</i> de <i>S. meliloti</i> GR4; Tc ^R	Este trabajo
pSTEP1	Derivado de pBluescript II KS conteniendo un fragmento <i>BglII-SalI</i> de 1,28 Kb procedente de pBRPF1 que incluye el final del gen <i>fadD</i> e inicio de SMc02163; Ap ^R	Este trabajo
pSTEP2	Derivado de pSTEP1 en el que un fragmento <i>EcoRV</i> de 318 pb se ha sustituido por el casete Sm/Spc de pHP45Ω; Ap ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pSTEP3	Derivado de pSTEP2 conteniendo un fragmento <i>SalI</i> de 1,88 Kb del final del gen SMc02163 y el final del gen <i>frk</i> de pBRPF1; Ap ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pSTEP4	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo un fragmento <i>EcoRV-XbaI</i> de 4,65 Kb de pSTEP3 portando la versión mutada del gen	Este trabajo

	SMc02163; Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	
pSUP202 <i>pol4</i>	Vector suicida derivado de pSUP202 portando región de clonaje múltiple de pBSL II; Tc ^R	(Fischer <i>et al.</i> , 1993)
pSUP202 <i>pol4pgi</i>	Derivado de pSUP202 <i>pol4</i> conteniendo un fragmento <i>EcoRV-XbaI</i> de 4,65 Kb de pSTEP3 portando la versión mutada del gen SMc02163; Sm ^R , Spc ^R , Tc ^R	Este trabajo
pTE3	Vector IncP que porta el promotor <i>trp</i> de <i>S. enterica</i> serovar <i>Thyphimurium</i> ; Tc ^R	(Egelhoff & Long, 1985)
pTYB2	Vector de expresión para proteínas de fusión portador del promotor T7, Ap ^R	New England Biolabs [®]
pTYB2- <i>pgi</i>	Derivado de pTYB2 conteniendo un fragmento <i>NdeI-SmaI</i> de 1,62 Kb correspondiente al amplificado del gen SMc02163, Ap ^R	Este trabajo
pUC18	Vector de clonación, Ap ^R	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
RP4-11	Derivado del plásmido RP4 IncP; Ap ^R Km ^R	(Quandt <i>et al.</i> , 2004)

1.2. MEDIOS DE CULTIVO

- MEDIO LB

Medio rico de cultivo (Luria-Bertani) (Miller, 1972) empleado para el crecimiento rutinario de las cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Su composición es:

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

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

- MEDIO TY

Medio de cultivo (Tryptone yeast) (Beringer, 1974) empleado para el crecimiento rutinario de las cepas de *S. meliloti*, *R. etli*, *M. ciceri*. Su composición es:

Tryptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,45 g
Agar (para medio sólido)	15 g
Agua desionizada	1000 ml

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

- MEDIOS MÍNIMOS

- MEDIO MÍNIMO M9

Medio mínimo de cultivo (Miller, 1972) empleado para el crecimiento rutinario de las cepas de *E. coli*. Su composición es:

MgSO ₄ · 7H ₂ O.....	0,15 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
Agua desionizada	1000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Tras el autoclavado se añadió 10 ml de una solución de CaCl₂ 0,01 M esterilizado tras autoclavado a 120 °C durante 20 minutos. Finalmente se adicionaron 25 ml de una solución al 20% de una fuente carbonada (glucosa o fructosa) y 0,1 ml de una solución de HCl de tiamina (0,1 g / 1000 ml), soluciones que se esterilizaron previamente mediante filtración a través de unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 µm de diámetro de poro.

- MEDIO MÍNIMO AB

Para los medios mínimos de crecimiento e inducción de cepas de *A. tumefaciens* se partió de las dos soluciones madre siguientes:

SALES AB (solución concentrada 20 x)

NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄	6 g
KCl	3 g
CaCl ₂ · H ₂ O	0,26 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g
Agua desionizada	1000 ml

TAMPÓN (solución concentrada 20 x)

K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	78,6 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	23 g
Agua desionizada	1000 ml

El pH se ajustó a 7. Se esterilizaron ambas soluciones separadamente en autoclave a 120 °C durante 20 min.

➤ Medio mínimo de crecimiento AB

50 ml SALES AB (20 x)

50 ml TAMPÓN (20 x)

900 ml solución de glucosa 0,5 % (p/v) estéril

➤ Medio mínimo de inducción AB

Medio de cultivo empleado para la inducción de los genes *vir* de *A. tumefaciens*

1 x SALES AB

50 mM MES pH 5,6

2 mM solución NaHPO₄ – NaH₂PO₄ pH 5,6

0,5 % glucosa

100 μM acetosiringona

● MEDIO MÍNIMO

Medio de cultivo para *Rhizobium* de (Robertsen *et al.*, 1981) modificado

K₂HPO₄

0,3 g

KH₂PO₄

0,3 g

MgSO₄ · 7 H₂O

0,15 g

MATERIAL Y MÉTODOS

CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃	0,006 g
NaCl	0,05 g
Glutamato sódico	1,1 g
Manitol	10 g
Agar purificado (para medio sólido) ...	13 g
Agua desionizada	1000 ml

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

Solución concentrada de vitaminas (1000 x):

Biotina	0,2 g
HCl de tiamina	0,1 g
Pantotenato sódico	0,1 g
Agua desionizada	1000 ml

Se esterilizó a través de unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 µm de diámetro de poro. Se añadió 1 ml/litro al medio mínimo autoclavado.

En aquellos casos en los que fue necesario realizar modificaciones en la fuente de carbono y nitrógeno se preparó el medio de cultivo en ausencia de manitol y glutamato sódico. Tras su esterilización, se adicionaron 25 ml de una solución al 20% de una fuente carbonada (glucosa, fructosa, succinato, glicerol) y 6 ml de una solución de KNO₃ 1M, ambas esterilizadas por filtración con unidades Minisart[®] NML.

1.3. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Para el mantenimiento de cepas bacterianas de forma prolongada se recogieron alícuotas en fase logarítmica de los cultivos en criotubos que contenían glicerol estéril para una concentración final de 20%. Los criotubos se almacenaron a una temperatura de -80 °C.

1.4. ANTIBIÓTICOS

Los distintos antibióticos utilizados en los medios de cultivos fueron preparados como soluciones concentradas (x 100) en agua desionizada y esterilizados a través de unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de la preparación de tetraciclina y cloranfenicol el empleo de alcohol y de una mezcla

hidroalcohólica como solventes hizo innecesaria su esterilización. La concentración final de los antibióticos se detalla en la Tabla 3.

Tabla MyM.3. Concentración final de antibióticos utilizados.

Antibiótico	Concentración (µg/ml)			
	<i>S. meliloti</i>	<i>R. etli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>
Sulfato de estreptomicina (Sm)	200	-	-	50
Sulfato de kanamicina (Km)	200	50	50	50
Espectinomicina (Spe)	100	100	100	50
Tetraciclina (Tc)	10	2,5	10	10
Ampicilina (Ap)	-	-	-	200
Rifampicina (Rif)	-	-	50	-
Nalidixico (Nx)	-	-	-	20
Gentamicina (Gm)	20	-	-	10

1.5. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA EN CONDICIONES DE LABORATORIO

1.5.1. CONJUGACIONES BIPARENTALES

Se realizaron a partir de un cultivo donador en fase logarítmica de crecimiento temprana ($DO_{600\text{ nm}} = 0,1 - 0,2$) y de un cultivo receptor en fase logarítmica de crecimiento tardía. Se centrifugaron donador y receptor en proporción 1:1 en un tubo de microfuga y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) con objeto de eliminar los restos de antibióticos. La mezcla resultante se resuspendió finalmente en un pequeño volumen de medio (50 -100 µl) y se depositó sobre un filtro Millipore estéril (0,45 µm de poro y 2,5 cm de diámetro), que previamente se había colocado sobre una placa de medio sólido (LB, MM ó TY en función al medio selectivo requerido para la conjugación). La mezcla de conjugación se incubó 16-20 horas a 28 °C. Transcurrido este tiempo, dicha mezcla se resuspendió en medio líquido estéril y se efectuaron diluciones seriadas que fueron posteriormente sembradas en placas conteniendo medio sólido adicionado con los correspondientes antibióticos.

Se realizaron recuentos de donador, receptor y transconjugantes con objeto de

calcular la frecuencia de transferencia conjugativa, que se corresponde con el número de transconjugantes obtenidos dividido por el número total de células del donador. Como control, y para determinar la tasa de resistencia espontánea a los antibióticos selectivos, se llevaron a cabo mezclas conjugativas que únicamente incluían el receptor o el donador.

1.5.2. CONJUGACIONES TRIPARENTALES

Se realizaron para la transferencia de plásmidos no autotransmisibles desde cepas no movilizadoras de *E. coli* a *Rhizobium* usando el plásmido movilizador en *trans* pRK2013. El procedimiento seguido fue similar al de las conjugaciones biparentales, utilizando en este caso mezclas donador:movilizador:receptor en la proporción 1:1:1.

1.6. SELECCIÓN DE INTERCAMBIO ALÉLICO Y CO-INTEGRACIÓN

Mutaciones dirigidas a genes específicos de *S. meliloti* se llevaron a cabo mediante: a) intercambio del alelo silvestre por una versión mutada previamente clonada en un vector suicida (pK18*mobsacB* o pSUP202*pol4*), o b) mediante co-integración de una construcción plasmídica.

a) Para seleccionar el intercambio alélico, se procedió tal y como se describe en Schäfer et al. (1994). El vector suicida conteniendo la versión mutada del alelo se transfiere mediante conjugación a la cepa de *S. meliloti* que se desea mutagenizar. En el caso de haber empleado pSUP202*pol4*, se seleccionan transconjugantes resistentes a los antibióticos para los que confiere resistencia el interposón utilizado en la interrupción del alelo, y que sean sensibles a Tc. En el caso de haber empleado pK18*mobsacB* como vector, en una primera fase se seleccionan aquellos transconjugantes en los que haya ocurrido un simple entrecruzamiento, los cuales deben ser, además de resistentes a los antibióticos para los que confiera resistencia el interposón utilizado en la interrupción del alelo, Km^R y Sac^S. Para seleccionar el doble entrecruzamiento, se crece 1 colonia en medio no selectivo durante 24-48 horas, periodo tras el cual se siembran alícuotas del cultivo en placas de MM conteniendo sacarosa 10% y los antibióticos para los que confiere resistencia el interposón. La pérdida de secuencias del vector se confirma adicionalmente por la sensibilidad de los clones a Km.

b) Para interrumpir la secuencia codificante de un gen por co-integración, un fragmento interno al gen de estudio de un tamaño mínimo de 500 pb se clona en un vector suicida. Tras su transferencia por conjugación, se seleccionan transconjugantes Km^R y Sac^S, o Tc^R, dependiendo de que se haya empleado pK18*mobsacB* o pSUP202*pol4*, respectivamente.

1.7. ENSAYO DE MOVIMIENTO MULTICELULAR (SWARMING)

Para analizar el desarrollo de migración multicelular conocido por “swarming” en cepas de *S. meliloti* se siguió la metodología propuesta por Soto *et al.*, (2002).

Se crecieron cultivos de las cepas de *S. meliloti* en medio rico TY hasta alcanzar la fase logarítmica tardía ($DO_{600} = 1 - 1,2$). Se centrifugó 1 ml de cultivo y el precipitado de células fue lavado dos veces con 1 ml de medio mínimo adecuado a cada condición de ensayo para resuspender finalmente en 100 μ l del mismo medio. Previamente se prepararon placas con 20 ml de medio mínimo adecuado a cada condición de ensayo conteniendo 0,7 % y 0,4 % (p/v) de agar purificado, que se dejaron gelificar 15 minutos al aire en campana de flujo laminar. Se colocaron sobre la placa 2 μ l de cada cepa previamente lavada como se ha indicado y se dejó secar al aire en cámara de flujo laminar durante 10 minutos. Las placas fueron incubadas invertidas a 28 °C durante 14 -16 horas.

2. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA EN CULTIVOS CELULARES

La actividad β -galactosidasa se determinó en cepas que contenían fusiones transcripcionales del gen o la región génica de interés con el gen informador *lacZ* siguiendo la metodología descrita por Sambrook *et al.*, (1989). Las cepas a estudio se cultivaron en medio rico (TY ó LB) con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar la fase exponencial y se siguieron los siguientes pasos:

- Los cultivos crecidos se diluyeron en el medio de cultivo adecuado a cada condición de ensayo añadiendo tetraciclina para el mantenimiento del plásmido que presenta la fusión transcripcional. En el caso del medio mínimo, los cultivos fueron lavados varias veces con este medio antes de su inoculación. Cuando fue necesario reproducir las condiciones inductoras de los genes *nod* se adicionó luteolina a una concentración de 5 μ M en metanol 100%. Cuando se pretendía la simulación de las condiciones inductoras de los genes de virulencia de *Agrobacterium*, los cultivos crecidos en medio rico se diluyeron en medio mínimo de crecimiento AB hasta fase exponencial. Tras varios lavados con medio mínimo AB se diluyeron finalmente en medio mínimo de inducción AB.
- De estos cultivos se tomaron alícuotas de 100 μ l y se anotó el valor de DO_{600} . Las células fueron aisladas mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 3 minutos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como muestra control se tomaron 100 μl del medio de cultivo que siguieron el mismo tratamiento que las muestras problema.

- La lisis celular se consiguió tras añadir 900 μl de Buffer Z, 20 μl de cloroformo y 5 μl 0.1 % SDS y se agitó mediante vórtex la mezcla durante 10 segundos.
- Las muestras se incubaron a 30 °C durante 10 minutos.
- La actividad β -galactosidasa comenzó tras añadir 200 μl de una solución 4 mg/ml del sustrato orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) en tampón Z y mezclar con vórtex.
- Las muestras se incubaron a 30°C hasta que la coloración amarilla fue suficientemente intensa y estable.
- La reacción se detuvo por la adición de 500 μl de una solución 1 M Na_2CO_3 , se anotó el tiempo transcurrido desde la adición de ONPG y se separaron los restos celulares por centrifugación durante 3 minutos a 12.000 rpm.
- El sobrenadante se recogió en un nuevo tubo y se determinó la absorbancia a 420 nm, sustrayendo en las muestras problema el valor obtenido para el control.
- La actividad β -galactosidasa se expresó en unidades Miller (U) mediante la siguiente fórmula:

$$U = \frac{1000 \times A_{420}}{t \times V \times A_{600}}$$

Donde A_{420} y A_{600} son los valores de DO obtenidos a la longitud de onda de 420 nm y 600 nm, respectivamente. El valor t corresponde al tiempo de incubación en minutos mientras que V es el volumen de cultivo utilizado en mililitros.

TAMPON Z :

- o $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (0,06 M)
- o $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,04 M)
- o KCl (0,01 M)
- o $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,001 M)
- o β - mercaptoetanol (0,05 M)

2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA (REACTIVO DE BRADFORD)

La concentración de proteína presente en las diferentes muestras se ha determinado según el método descrito por Bradford (1976). En el caso de la medida de proteína en cultivos celulares fue necesario realizar previamente un tratamiento de lisis que se describe a continuación:

A una alícuota de cultivo se añadió un volumen igual de NaOH 1 N. La mezcla se agitó mediante vórtex y se hirvió durante 20 minutos, centrifugando a continuación a 12.000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Del sobrenadante se tomaron alícuotas (25-50 μ l) para la medida.

- El volumen de muestra conteniendo proteína se completó con agua destilada hasta un volumen final de 800 μ l.
- Se añadieron 200 μ l de reactivo de Bradford de BioRad Protein Assay (BioRad[®] laboratorios) e inmediatamente se agitó mediante vórtex y se incubó entre 5 minutos y una hora a temperatura ambiente.
- Se midieron los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm utilizando como blanco una mezcla que contenía 800 μ l de agua destilada y 200 μ l de reactivo de Bradford.
- La concentración de proteína se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia a una curva patrón obtenida a partir de cantidades crecientes de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma)

2.3. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS BACTERIANOS

El aislamiento de los exopolisacáridos bacterianos producidos por *S. meliloti* se llevó a cabo mediante el método descrito por Lloret *et al.*, (1998).

- Para ello, se prepararon preinóculos de las cepas a estudio en medio TY con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar la fase estacionaria.
- Los preinóculos se lavaron varias veces con medio mínimo sin fuentes de nitrógeno y carbono, para posteriormente diluirlos en 5 ml de medio mínimo con las fuentes de carbono adecuadas a cada condición de ensayo.
- Una vez que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, las células fueron separadas por centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- A los sobrenadantes se añadieron tres volúmenes de etanol absoluto frío para

precipitar los exopolisacáridos presentes y se mantuvieron los tubos a 4 °C durante al menos 24 horas.

- Tras la incubación las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 500 µl de agua destilada estéril y se cargó en membranas de diálisis Spectra/Por[®] 7 (Spectrum laboratorios) de 1.000 Da de tamaño de poro.
- Las muestras se dializaron frente a agua destilada a 4 °C durante 48 h, con un cambio de agua destilada a las 24 horas. Las muestras dializadas se recogieron en tubos de microfuga. Se determinó el contenido en azúcares totales según el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) que consiste en:
 - o A 100 µl de la muestra se le adicionaron 100 µl de agua destilada estéril en tubos de ensayo.
 - o Se añadieron a la mezcla 200 µl de fenol 5% (v/v) e inmediatamente 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, las muestras se incubaron 10 minutos en reposo.
 - o Transcurrido este tiempo, los tubos se agitaron mediante vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - o Tras la incubación se midió la absorbancia de las muestras en cubetas de vidrio de 10 mm de paso de luz (Starna Lts.) a una longitud de onda de 490 nm. Como control se usaron 200 µl de agua destilada estéril que siguieron el mismo protocolo que la muestra a estudio.
 - o La cantidad de azúcares totales se determinó mediante interpolación de los valores de absorbancia a una recta patrón obtenida con concentraciones crecientes de glucosa (de 20 a 100 µg).

2.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTO CELULAR PARA MEDIDA DE ACTIVIDAD FOSFOGLUCOISOMERASA (PGI).

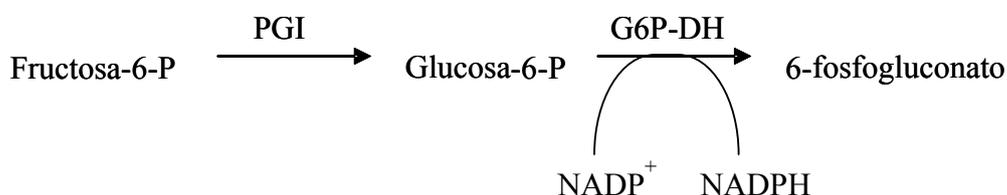
Para la obtención de extracto crudo celular tanto en cepas de *E. coli* como en *S. meliloti* se utilizó el siguiente protocolo:

- Se crecieron las bacterias en 100 ml en medio de cultivo (LB o TY) adicionado de los correspondientes antibióticos y se incubaron en agitación a 37 °C ó 28 °C respectivamente por un período de 12 a 15 horas.
- Transcurrido este tiempo los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos (*E. coli*) ó a 10.000 rpm 10 minutos (*S. meliloti*)

- El sedimento se resuspendió en 1 volumen de tampón 5 mM NaH₂PO₄ – Na₂HPO₄ pH 7.
- Después de una nueva centrifugación, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 4 ml (*E. coli*) ó 3 ml (*S. meliloti*) de tampón 5 mM NaH₂PO₄ – Na₂HPO₄ pH 7 conteniendo 50 µM de inhibidor de proteasas PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride). Las células se sometieron a rotura mediante 3 pases en una minicélula de prensa de French a 1000 PSI.
- El lisado celular se centrifugó para separar los restos celulares a 10.000 rpm durante 5 minutos (*E. coli*) ó a 10.000 rpm 10 minutos (*S. meliloti*).
- El sobrenadante se trasvasó a tubos Falcon y se mantuvo en hielo hasta su uso como extracto celular soluble.

2.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FOSFOGLUCOISOMERASA (PGI)

La medida de actividad PGI se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Noltmann (1966), determinando la conversión de fructosa-6-fosfato en glucosa-6-fosfato. La producción de glucosa-6-fosfato es seguida por el cambio en la absorbancia a 340 nm producido por el NADPH que se genera en una reacción acoplada catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa tal y como se indica en la siguiente reacción:



La mezcla de reacción (1ml) estaba compuesta de: 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6) ; 2 mM Na-fructosa-6-P ; 0.5 mM β-NADP; 1 µg de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y proteína PGI purificada (20 ng) o extracto celular crudo (25 – 50 µl). El incremento en la absorbancia fue registrado durante un tiempo total de 70 segundos con un retraso inicial de medición de 10 segundos y un intervalo de medida cada 10 segundos.

La actividad específica se calculó como nmoles de NADPH producidos por minuto y mg de proteína, teniendo en cuenta que:

$$\Delta A = \varepsilon (\Delta c \times d)$$

Donde,

ΔA = Variación de la absorbancia por minuto

ϵ = coeficiente de extinción molar NADPH = $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d = distancia del paso de luz de la cubeta del espectrofotómetro = 1 cm

Δc = número de moles de NADPH producidos por litro y por minuto.

2.6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA

La actividad nitrogenasa presente en los nódulos se cuantificó mediante el método de actividad reductora de acetileno (ARA) basado en Hardy (Hardy *et al.*, 1973). El método realizado consistió en:

- Se tomaron tubos de 20 x 200 mm conteniendo 4 plantas de alfalfa noduladas con diferentes tiempos post-inoculación y cultivadas según la metodología descrita en el apartado 4.13.
- Se eliminó la solución nutritiva contenida en los tubos.
- Se colocaron tapones de goma para el sellado hermético de los tubos.
- Se retiró un 10 % del volumen de aire de los tubos de plantas con una jeringa y se reemplazó con acetileno de botella obtenido por mezcla de carburo cálcico con agua (100 ml de agua a 6,6 gramos de carburo cálcico).
- Se tomaron muestras de 1 ml de la atmósfera gaseosa interna con la ayuda de jeringas a los 10 y 20 minutos de la adición del acetileno.
- Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890, equipado con un detector de ionización de llama y una columna metálica (180 x 3,2 mm) empaquetada con Porapak Q de 80 – 100 mesh. La temperatura del horno, inyector y detector fueron 60 °C, 120 °C y 105 °C, respectivamente. Como gas portador se empleó nitrógeno a una presión de 2 Bar. La llama del inyector se preparó a partir de una mezcla hidrógeno y aire (1:2) Bar de presión. Los datos fueron recogidos en un integrador Hewlett Packard modelo 3396.
- Previamente a la medida de las muestras se realizó la determinación de distintas concentraciones de etileno puro para crear una curva patrón.
- La identificación de los picos de etileno de las muestras así como la concentración de etileno se obtuvieron por interpolación al volumen de pico obtenido de la curva patrón.
- Finalmente los valores de ARA se expresaron como nmoles de etileno producido por

hora por gramo de peso fresco de los nódulos.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) que se describe a continuación:

- Se inocularon 3 ml de medio suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C en el caso de *E. coli* ó 28-30 °C en el caso *S. meliloti*, durante 12-15 h en agitación a 190 rpm.
- Se centrifugaron las células en tubos de microfuga (12.000 rpm, 3 minutos) y se retiró el sobrenadante mediante el empleo de micropuntas.
- En el caso de *S. meliloti* o *A. tumefaciens*, se realizó un paso adicional para el lavado de polisacáridos de superficie que consistió en resuspender el sedimento en 200 µl de Sarcosil 0,1% en TE. Se centrifugaron las células (12.000 rpm, 3 minutos) y se desechó el sobrenadante.
- El sedimento se resuspendió mediante vórtex en 100 µl de solución I, y se mantuvo 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadieron 200 µl de solución II. Se mezclaron los tubos por inversión manual y se incubaron 5 minutos en hielo.
- Se añadieron 150 µl de solución III y se mezcló suavemente por inversión manual varias veces. La mezcla se mantuvo en hielo 10 minutos y se centrifugó (12.000 rpm, 5 minutos).
- El sobrenadante (aproximadamente 400 µl) se transfirió a un nuevo tubo y se le añadió un volumen de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1). Se agitó con vórtex y se centrifugó (12.000 rpm, 5 minutos).
- La fase superior acuosa, que contiene el ADN, se transfirió a un nuevo tubo.
- Se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a - 20 °C y se mantuvo 30 minutos a - 80 °C. Posteriormente se centrifugó (12.000 rpm, 15 minutos).
- Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le añadieron 200 µl de etanol al 70%. Se centrifugó (12.000 rpm, 3 minutos) y se eliminó el sobrenandante.
- El precipitado se secó al vacío.
- Finalmente el precipitado se resuspendió en 20 µl de tampón TE o H₂O bidestilada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para eliminar el ARN, al volumen anterior se le puede añadir 1 μ l de ribonucleasa A concentrada (10 mg/ml en NaCl 15 mM y Tris HCl 10 mM pH 7,5). Antes de su utilización, la solución concentrada de RNasa se calentó a 100 °C durante 15 minutos se dejó enfriar a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a – 20 °C. Alternativamente, el ARN se puede eliminar durante la digestión con enzimas de restricción utilizando una dilución 1/200 de la solución concentrada de RNasa en agua bidestilada para completar el volumen de digestión.

SOLUCIONES:

- **Solución I:**
Glucosa 50 mM
EDTA 10 mM
Tris-HCl 25 mM pH 8
Lisozima, 4mg/ml
- **Solución II:**
NaOH 0,2 M
SDS 1%
- **Solución III:**
Acetato potásico 5 M (60 ml)
Ácido acético glacial (11,5 ml)
H₂O (28,5 ml); pH 4,5
- **Tampón TE:**
Tris 10 mM
EDTA 1 mM, pH 8,0
- **Mezcla fenol:cloroformo** (1:1): Está constituida por una mezcla 1:1 de alcohol isoamílico: cloroformo (1:24) y fenol al 100% en 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0).

En ocasiones cuando fue necesario una extracción rápida de ADN plásmidico de elevado número de copias en cepas de *E. coli* se procedió con el método de aislamiento rápido mediante hervido “Boiling prep” descrito por Delsal (Delsal *et al.*, 1988) como se indica a continuación:

- Se crecieron cultivos de la cepa bacteriana de *E. coli* en 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, a 37 °C durante 12-15 h.
- Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo crecido durante 3 minutos a 4 °C en tubos de

microfuga.

- Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió vigorosamente en 110 µl de solución STET, preenfriada a 4 °C, conteniendo 0,5 mg/ml de lisozima.
- Los tubos se hirvieron durante 30 segundos a 100 °C.
- Posteriormente se centrifugaron los tubos a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- El precipitado de restos celulares se retiró mediante la ayuda de un palillo de dientes.
- Se añadieron 110 µl de isopropanol al sobrenadante, se agitó ligeramente con vórtex para mezclar y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- Se desechó el sobrenadante con una micropunta.
- Se añadieron al sedimento 200 µl de etanol 70% y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos.
- Se retiró el sobrenadante con una micropunta y se secó el precipitado al vacío.
- El precipitado se resuspendió con 20 µl de tampón TE o agua bidestilada.

Solución STET:

8 % sacarosa, 5 % Tritón X-100, 50 mM TrisHCl pH 8.0 y 50 mM EDTA

Alternativamente, cuando se requería una mayor pureza de ADN plasmídico (Ej. secuenciación), se utilizó el producto comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) como se indica a continuación:

- Cultivos de *E. coli* se inocularon en 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C durante 12-15 h.
- Se centrifugaron las células en tubos de microfuga (12.000 rpm, 3 minutos). Se retiró el sobrenadante mediante el empleo de micropuntas.
- Se resuspendió el sedimento en 200 µl de Solución de Resuspensión.
- Se añadieron 200 µl de Solución de Lisis y se invirtieron manualmente para mezclar. Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadieron 350 µl de Solución de Neutralización, se mezcló por inversión manual varias veces y se centrifugó a 12.000 rpm, 10 minutos.
- El sobrenadante se aplicó a una columna que previamente se había lavado con 500 µl de Solución de Preparación de Columna.
- Se centrifugó (12.000 rpm, 1 minuto) para retener el ADN plasmídico y se eliminó el sobrenadante.

- Se añadieron 750 µl de Solución de Lavado a la columna y se centrifugó (12.000 rpm, 1 minuto). La centrifugación se repitió una vez más para eliminar el exceso de solución.
- Se colocó la columna en un tubo de microfuga de 1,5 ml y se añadieron 50 - 100 µl de agua bidestilada estéril. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó (12.000 rpm, 1 minuto) para recuperar el ADN.

3.2. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO TOTAL

Para la obtención del ADN genómico total se empleó la siguiente metodología:

- Se inoculó un cultivo de 3-5 ml en TY, y se dejó crecer hasta que alcanzó la fase exponencial tardía de crecimiento ($D.O_{600\text{ nm}} = 0,9 - 1,1$).
- Se tomaron 1,5 ml de cultivo y se centrifugaron en tubos de microfuga (12.000 rpm, 3 minutos).
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió mediante vórtex con 500 µl de Sarcosil 0,1% en TE. Se centrifugó (12.000 rpm, 3 minutos).
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 1 ml de NaCl 1 M.
- La solución se incubó a 4 °C durante 30-60 minutos agitando manualmente. Se centrifugó (12.000 rpm, 3 minutos).
- El sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió hasta homogeneidad en 250 µl de tampón TE sacarosa 20%.
- Se añadieron 250 µl de lisozima (5 mg/ml tampón TE) (ARNasa 1 mg/ml) y se mezcló mediante vórtex. La mezcla se incubó 30 minutos a 37 °C.
- Se adicionaron 100 µl de tampón TE 5% sarcosil con pronasa (10 mg/ml) y se mezcló manualmente. La solución se incubó 60 minutos a 37 °C.
- Se añadieron 70 µl de una solución de acetato sódico (3 M) pH 5,2, 200 µl de solución fenol:cloroformo (1:1) y 200 µl de solución de fenol 100%. Se agitó mediante vórtex y se centrifugó (12.000 rpm, 5 minutos)
- La fase superior acuosa que contiene el ADN se recuperó en un nuevo tubo.
- Para aumentar la limpieza del ADN se repitió el lavado con 400 µl de solución fenol-cloroformo (1:1).
- A la fase acuosa se añadieron 300 µl de cloroformo y se centrifugó (12.000 rpm, 5 minutos) para pasar posteriormente el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Al sobrenadante se añadieron 700 µl de isopropanol y se mezcló por inversión suave,

incubando a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Se centrifugó (12.000 rpm, 15 minutos) y se eliminó el sobrenadante.

- El precipitado se lavó con 500 μl de etanol 70 %
- Las muestras se secaron al vacío y se resuspendieron con 100 μl de tampón TE (1:10). Para solubilizar las muestras se incubaron durante 30 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ mezclando con micropuntas.
- Finalmente las muestras se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período breve de tiempo o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período largo.

Para la extracción de ADN genómico total de mayor pureza se empleó el sistema AquaPure Genomic DNA isolation kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Se partió de un cultivo de 3- 5 ml en TY de las cepas de *S. meliloti* hasta alcanzar fase exponencial tardía de crecimiento ($D.O_{600\text{ nm}} = 0,9 - 1,1$).
- Se tomaron 500 μl del cultivo y se centrifugaron durante 15 segundos a 12.000 rpm para retirar el sobrenadante con una micropunta.
- Las células se lisaron con 300 μl de solución de lisis, incubando a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
- La muestra se atemperó hasta temperatura ambiente y se añadieron 1,5 μl de solución de ARNasa A (4 mg/ml).
- Se mezcló mediante inversión manual repetidamente y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período de 15 a 60 minutos.
- La muestra se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 100 μl de solución de precipitación de proteínas. Se mezcló mediante vórtex vigorosamente durante unos 20 segundos.
- Se centrifugó la muestra durante 3 minutos a 12.000 rpm y se trasvasó el sobrenadante conteniendo el ADN a un tubo de microfuga conteniendo 300 μl de 100 % isopropanol.
- Se mezcló por inversión repetidamente y se centrifugó durante 1 minuto a 12.000 rpm, eliminando el sobrenadante.
- El precipitado se lavó con 300 μl de etanol 70 % y se centrifugó 1 minuto a 12.000 rpm descartando el sobrenadante.
- El tubo conteniendo la muestra se dejó secar invertido a temperatura ambiente 10 -15 minutos.
- La muestra se solubilizó añadiendo 50 -100 μl de solución de hidratación e incubando

a 65 °C durante 5 minutos.

- Se agitó 5 segundos mediante vórtex para mezclar y la muestra se almacenó a 4 °C por un período breve de tiempo o a – 80 °C por un período largo.

3.3. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL

La manipulación de ARN se realizó extremando las condiciones de limpieza del material, con el fin de evitar la contaminación fortuita con ARNasas.

Para el aislamiento del ARN total de las cepas de *S. meliloti* se utilizó el sistema RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) modificado:

- Se partió de un cultivo inoculado en medio TY crecido en fase logarítmica ($DO_{600} = 0,6 - 0,7$)
- Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo durante 3 minutos a 12.000 rpm en tubos de microfuga. Se eliminó el sobrenadante y se repitió nuevamente la centrifugación eliminando el sobrenadante residual con una micropunta.
- El precipitado de células se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a – 80 °C.
- En el momento de su uso se descongelaron en hielo 4 viales de células por cada cepa.
- Se añadieron 100µl de una solución de lisozima 4 mg/ml en tampón TE, se mezcló mediante vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- A la muestra se añadieron 350 µl de tampón RLT al que previamente se le había adicionado 10 µl/ml de β-mercaptoetanol. Se mezcló por inversión manual y se centrifugó 2 minutos a 12.000 rpm para eliminar los restos celulares.
- Al sobrenadante se añadieron 250 µl de etanol absoluto, se mezcló por inversión manual.
- Por cada columna de purificación se añadieron 2 viales, centrifugando 30 segundos a 12.000 rpm y eliminando el sobrenadante cada vez.
- La columna de purificación se lavó dos veces con 500 µl de tampón RPE, centrifugando 30 segundos a 12.000 rpm y retirando el sobrenadante cada vez.
- Se centrifugó 2 minutos a 12.000 rpm para eliminar el exceso de solución.
- La columna de purificación se colocó en un nuevo tubo de microfuga y se añadieron 30 µl de H₂O libre de RNAsa. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente para hidratar la resina. Se centrifugó 1 minuto a 12.000 rpm.
- El proceso se repitió nuevamente con 30 µl de H₂O libre de RNAsa.
- El volumen total obtenido (60 µl) en las dos rondas se unió y se guardó a – 80 °C.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN Y ARN

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). La absorbancia (A_{260} y A_{280}) de las soluciones de ADN o ARN en agua o en TE se determinaron utilizando como blanco agua o TE, respectivamente. La concentración se calculó respecto a los valores estándar de $DO_{260} = 1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena doble. En el caso de muestras de ARN se determinó su concentración a través de valores estándar de $DO_{260} = 1$ en soluciones con 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN en espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.). Para estimar la pureza de muestras de ADN se tomó la relación DO_{260}/DO_{280} , considerándose valores inferiores a 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de la fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). En el caso de muestras de ARN se rechazaron aquellas muestras cuya relación DO_{260}/DO_{280} mostró valores inferiores a 2.0 por falta de pureza.

3.5. DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

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

Las digestiones con más de una enzima de restricción que requerían el mismo tampón y temperatura se realizaron simultáneamente. Para aquellas digestiones que funcionaban con tampones diferentes, se digirió primero con la enzima que necesitaba el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando no fue posible, se realizó primero la digestión con una enzima. A continuación, se añadió agua bidestilada estéril hasta un volumen mínimo de 300 μl y un volumen de mezcla fenol/cloroformo (1:1). Se continuó con los pasos 7 a 11 del apartado 3.1 de esta misma sección, tras la fenolización se adicionó un 10 % (v/v) de una solución de CILi 4M al sobrenadante para favorecer la precipitación del ADN. Se resuspendió en un volumen adecuado de agua bidestilada (10-20 μl) y a continuación se llevó a cabo la digestión con la segunda enzima.

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

3.6.1. ELECTROFORESIS DE ADN

La separación de fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparados en tampón TBE (Tris 50 mM; EDTA- Na_2 2,5 mM; BO_3H_2 50 mM; pH 8,2). La concentración de agarosa estándar fue del 0,8 %, elevándose la concentración de ésta en los casos en los que la presencia de fragmentos pequeños de ADN lo requería. El voltaje usual de trabajo fue 80 voltios en cubetas de electroforesis Wide mini-sub[®] GT y de 60 voltios en cubetas de electroforesis Mini-sub[®] GT (BioRad). Como tampón de carga se utilizó una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua destilada en proporción de 1 μl por cada 5 μl de la solución de ADN. En los casos en que los fragmentos de restricción correspondían a tamaños cercanos o inferiores a 500 pb se empleó como tampón de carga una mezcla de sacarosa al 40% y naranja de acridina para una mejor visualización.

3.6.2. REVELADO DE GELES Y FOTOGRAFÍA

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los mismos en una solución que contenía 4-5 gotas de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) en 500 ml de agua destilada, durante 15-20 minutos. Posteriormente se observaron bajo luz UV (260 nm) en un transiluminador.

Para la visualización e impresión se utilizó una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509) y el analizador de imágenes Quantity One de BioRad[®].

3.6.3. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se efectuó teniendo en cuenta la relación logarítmica entre el tamaño molecular relativo (M_r) de las moléculas de ADN y la movilidad relativa (R_f) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron los fragmentos de restricción del ADN del fago λ resultantes de la digestión con endonucleasa *Hind*III (Marcador II) o *Eco*RI/*Hind*III (Marcador III). Para fragmentos inferiores a 500 bp se utilizó el marcador 100 Base pair

ladder (GE, Healthcare).

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

La purificación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante el método de electroelución en bolsas de diálisis descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Previamente se prepararon membranas de diálisis Spectra/Por[®] 4 de 16 mm de diámetro y 12.000 – 14.000 Da de tamaño de poro, mediante calentamiento a 90 °C en 1 mM EDTA/ 2 % NaHCO₃ durante 10 minutos, lavados dos veces en agua destilada y conservadas en agua destilada adicionada con una pequeña cantidad de etanol 98 % hasta el momento de su utilización.

- La banda correspondiente se recortó del gel de agarosa y se introdujo en una bolsa de diálisis previamente lavada en agua destilada y sellada con cierres Spectra/Por[®] conteniendo 500 µl de tampón de electroforesis TBE, eliminando cuidadosamente las burbujas de aire presentes en la bolsa.
- La bolsa de diálisis conteniendo el fragmento, se colocó en una cubeta de electroforesis de tal modo que la longitud del trozo de gel estuviera en paralelo a los electrodos de la cubeta de electroforesis, lo más cercano al polo negativo. Se aplicó un voltaje de 120 voltios durante 20 minutos para forzar la migración de la banda hacia la solución presente en la bolsa.
- Tras este tiempo, se aplicó 1 minuto con voltaje inverso para disociar el ADN adherido a la bolsa.
- Tras comprobar con luz ultravioleta que no quedasen restos de ADN en el gel, se tomó el volumen de TBE conteniendo el fragmento de ADN en solución y se transfirió en un tubo de microfuga.
- Se añadieron 50 µl de una solución de acetato sódico 3 M pH 5,2 se agitó en vórtex y se añadieron 2,5 volúmenes (aproximadamente 1 ml) de etanol absoluto preenfriado. Se mezcló por inversión manual y se incubó 20 minutos a – 80 °C.
- Tras una centrifugación de 15 minutos a 12.000 rpm se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 300 µl de etanol 70 %. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado al vacío.
- Finalmente se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada o tampón TE.

3.8. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN EN VECTORES DE CLONACIÓN

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

- En un tubo de microfuga, se adicionó para una reacción de 20 μ l:
 - x μ l de ADN vector
 - y μ l de ADN inserto
 - 1 μ l de DNA ligasa del fago T4 (1 unidad/ μ l)
 - 2 μ l de tampón de la ligasa (concentrado 10x)
 - H₂O bidestilada, completar hasta 20 μ l.

La proporción de vector:inserto se mantuvo en relación molar 1:3 El número de moléculas se determinó como la concentración del fragmento entre el tamaño en pares de base o kilobase. La cantidad x + y no excedió de 200 ng.

Para favorecer la eficiencia del proceso de ligación de extremos romos, se puede adicionar a la mezcla anterior 2 μ l de PEG 8000 (40%), esterilizado a 115 °C / 30 minutos.

- Se mezcló suavemente y se incubó durante 3 horas o toda la noche a 12-16 °C (para extremos cohesivos), ó durante 12-24 h a 20 °C (para extremos romos).

-

3.8.1. GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS A PARTIR DE EXTREMOS PROTUBERANTES EN 5'

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 5' protuberantes, se procedió a rellenar el extremo 3' de la cadena complementaria de la siguiente manera: se mezclaron en un microtubo 20 μ l de la solución de ADN, 1 μ l de una solución 1 mM de dNTPs y una unidad de enzima Klenow por cada μ g de ADN. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se realizó una electroforesis en gel de azarosa para purificar la muestra aislando la banda por electroelución (apartado 3.7)

3.8.2. GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS A PARTIR DE EXTREMOS PROTUBERANTES EN 3'

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 3' protuberantes, se procedió a la eliminación de la región desapareada de la siguiente forma: se mezclaron en un microtubo 20 µl de la solución de ADN, 1 µl de una solución 2 mM de dNTPs y una unidad de ADN polimerasa del fago T4 por cada µg de ADN. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a 12 °C y continuación se procedió como en el apartado anterior mediante electroforesis en gel de agarosa y aislamiento del ADN mediante electroelución.

3.9. ELIMINACIÓN DE ADN CONTAMINANTE EN MUESTRAS DE ARN TOTAL

Las muestras de ARN total obtenidas mediante el sistema RNeasy® Mini Kit (Qiagen) pueden presentar contaminación con ADN aunque la tecnología esté diseñada para el aislamiento selectivo de ARN. Para su eliminación, se llevó a cabo un tratamiento modificado con el sistema RNase Free DNase Set (Qiagen), mediante la enzima ADNasa I disuelta y alicuotada según las condiciones del fabricante:

- La reacción se llevó a cabo en un tubo de microfuga conteniendo 5 µl ADNasa I / 100 µl de ARN total en tampón RDD. La muestra se incubó 1 hora a 28 °C.
- Para purificar el ARN se añadieron por cada 100 µl de muestra, 350 µl de tampón RLT (conteniendo 10 µl de β-mercaptoetanol/ml) y 250 µl de etanol 100 %. Se mezcló por inversión manual y se añadió el volumen en una columna de purificación.
- Se centrifugó 30 segundos a 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante.
- Se lavó la columna con 350 µl de tampón RW1. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 segundos y el sobrenadante fue nuevamente descartado.
- Se continuó con dos rondas de lavado de la columna con 500 µl de tampón RPE centrifugando a 12.000 rpm durante 30 segundos y retirando el sobrenadante.
- Finalmente para eliminar el exceso de solución se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos. Se añadieron al sedimento de 30 a 50 µl de H₂O RNase Free, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente para hidratar la resina y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto la columna sobre un nuevo tubo de microfuga.
- El ARN obtenido se guardó a – 80 °C hasta su uso.

3.10. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN TOTAL

La integridad y distribución de tamaños del ARN obtenido se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % y tinción con bromuro de etidio. Las bandas de ARN correspondientes a ARN ribosómicos: 23 S (2,5 Kb) y 16 S (1,5 Kb) aparecieron como bandas regulares y en una proporción 2:1 respectivamente en aquellas muestras que presentaban una degradación del ARN muy baja. Asimismo, la ausencia de productos intermedios entre ambas bandas junto con una baja proporción en la banda de ARN ribosómico 5 S (120 pb), fueron también indicativos de muestras con baja tasa de degradación.

3.11. RT-PCR

La síntesis de ADNc desde las muestras de ARN total tratadas con ADNasa se siguió mediante el siguiente protocolo:

- Se mezclaron de 1 a 5 µg de ARN total, 1 µl de una solución conteniendo 100 ng/µl de una mezcla de oligonucleótidos (Random Primers, Roche), 1 µl de una mezcla 10 mM de dNTP y se completó el volumen hasta 12 µl con H₂O mQ autoclavada.
- Se incubó la muestra durante 5 minutos a 65 °C e inmediatamente se enfrió en hielo.
- Se añadieron 5 µl de Tampón de Síntesis 5x (First-strand, Invitrogen), 2 µl de 0,1 M DTT y 1 µl de inhibidor de ARNasa (40 U/µl, Protector RNase inhibitor, Roche).
- La mezcla se incubó a 25 °C durante 2 minutos, se añadió 1 µl de reversotranscriptasa (Superscript II reverse transcriptase, 200 U/µl, Invitrogen) y se incubó a 25 °C durante 10 minutos para la unión de los cebadores y, posteriormente, 50 minutos a 42 °C para la síntesis de ADNc.
- Finalmente para inactivar el enzima y parar la reacción se sometió a la mezcla a 65 °C durante 10 minutos.

Para la amplificación de productos reversotranscritos se utilizó el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según el apartado 3.14 tomando como ADN molde distintas diluciones de la muestras conteniendo ADNc. Así como un control negativo incluyendo ARN total sin reversotranscribir.

3.12. TRANSFORMACIÓN CELULAR

3.12.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* CON $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974).

- Se inoculó en medio LB una dilución 1/100 de un cultivo de *E. coli* en fase logarítmica tardía y se incubó en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de 0,3 – 0,6.
- Tras dejar enfriar en hielo durante 10 minutos, las células se centrifugaron (12.000 x g, 5 minutos, 4 °C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgCl_2 0,1 M preenfriada a 4 °C, y se centrifugaron de nuevo (3.000 x g, 5 minutos, 4 °C).
- A continuación, las células se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución de CaCl_2 0,1 M preenfriada a 4 °C. Se mantuvieron en hielo un mínimo de 30 minutos, se centrifugaron (3.000 x g, 5 minutos, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 del volumen de una solución de CaCl_2 0,1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4°C.
- Las células así preparadas se repartieron en alícuotas de 200 μl en tubos de microfuga preenfriados a 4 °C, que se conservaron a - 80 °C hasta su uso.

3.12.2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

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

- Alícuotas con 200 μl de células competentes se descongelaron en hielo (15-20 minutos).
- Se añadieron 50-100 ng de ADN plasmídico. Se mezcló mediante agitación suave y se incubó en hielo durante 45 minutos.
- La muestra se calentó (choque térmico) a 42 °C durante 2 minutos e inmediatamente se colocó en hielo de 2 a 5 minutos.
- Se adicionó medio LB hasta 1 ml, se incubó a 37 °C durante 1 h, agitando suavemente cada 20 minutos.
- Tras la incubación se sembraron diluciones en medio LB con los correspondientes antibióticos* y se incubó a 37 °C durante una noche.

* Si se llevó a cabo una selección por color se adicionó al medio 40 μl de una solución de 5-

Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal), (20 mg/ml en dimetilformamida).

3.12.3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

- *A. tumefaciens*

La preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium* se realizó según la técnica descrita por Hattermann y Stacey (Hattermann & Stacey, 1990). A partir de un precultivo en fase logarítmica tardía de la cepa a transformar se inoculó un matraz de 100 ml conteniendo el medio y los antibióticos apropiados y se incubó en agitación a 28 °C hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,4 a 0,6. Tras dejar enfriar en hielo durante 15 minutos, las células se centrifugaron (9820 x g, 10 minutos, 4 °C) y se resuspendieron en 1 volumen de H₂O estéril preenfriada. Se repitieron rondas de centrifugación y resuspensión en H₂O preenfriada con los siguientes volúmenes: 1 vez x 1 volumen, 2 veces x 0,5 volúmenes, 1 vez x 0,02 volúmenes; terminando por resuspender en 0,003 volúmenes de glicerol al 10% (esterilizado por filtración). Las células fueron almacenadas en alícuotas de 60 μ l en tubos de microfuga preenfriados a 4 °C, que se conservaron a - 80°C hasta su uso.

- *E. coli*

La preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se realizó según la técnica descrita por Dower y colaboradores (Dower *et al.*, 1988). A partir de un precultivo en fase logarítmica tardía de la cepa a transformar se inoculó un matraz de 100 ml conteniendo el medio y los antibióticos apropiados y se incubó en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,5 a 1. Tras dejar enfriar en hielo durante 15 minutos, las células se centrifugaron (4000 x g, 15 minutos, 4 °C) y se resuspendieron en 1 volumen de H₂O estéril preenfriada. Se repitieron rondas de centrifugación y resuspensión en H₂O preenfriada con los siguientes volúmenes: 1 vez x 1 volumen, 2 veces x 0,5 volúmenes; continuando con 0,02 volúmenes de glicerol al 10% (esterilizado por filtración) y finalmente 0,003 volúmenes de glicerol al 10% (esterilizado por filtración). Las células fueron almacenadas en alícuotas de 60 μ l en tubos de microfuga preenfriados a 4 °C, que se conservaron a - 80°C hasta su uso.

3.12.4. ELECTROPORACIÓN

Las transformaciones de las cepas de *A. tumefaciens* y *E. coli* también fueron llevadas a cabo mediante electroporación, la cual se realizó mezclando una alícuota de 60 μ l de células electrocompetentes preparadas según el apartado 3.12.3, descongeladas en hielo

con 1 μ l (aproximadamente 20 ng) de ADN resuspendido en H₂O. Tras 5 minutos de incubación, la mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm Gene Pulser[®] (BioRad Laboratories), manteniendo todo a 4 °C y evitando el contacto directo de las cubetas con el hielo. Se utilizó un electroporador ELECTRO CELL MANIPULATOR[®] 600 en las siguientes condiciones:

Choose mode:	T	2,5KV/Resistance High voltage (HV).
Set capacitance:	C	No usada en modo HV.
Set resistance:	R	R5 (129 ohm).
Set charging voltage:	S	1,3-1,5 KV.
Pulse length:	t	5-6 msec.

Tras el pulso, se añadió inmediatamente 1 ml de medio estéril y se incubó a 28 °C en agitación durante 4-20 horas para *A. tumefaciens* ó 37 °C para *E. coli*. Tras este tiempo se sembraron alícuotas de 10 y 100 μ l en medio selectivo.

3.13. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN ADN-ADN

3.13.1. TRANSFERENCIA DE ADN A FILTROS DE NYLON

Se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Southern (Southern, 1975) tal y como se describe a continuación:

- El ADN total digerido con la enzima de restricción requerida se separó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Habitualmente para un mejor desarrollo de se empleó un voltaje bajo durante la electroforesis.
- El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió.
- Posteriormente el gel se sometió a depurinación ácida del ADN sumergiéndolo dos veces durante 10 minutos en HCl 0,25 N hasta que el azul de bromofenol viró a amarillo. Tras este paso se retiró la solución ácida mediante un lavado con agua destilada.
- Seguidamente el gel se sometió a desnaturalización alcalina mediante dos lavados durante 15 minutos en una solución NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M. Tras este paso se retiró la solución alcalina mediante un lavado con agua destilada.
- El gel se neutralizó mediante su lavado durante 20 minutos en una solución Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M (pH 7,4). Tras este paso se retiró la solución de neutralización mediante un lavado con agua destilada.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Previamente se lavó en solución SSC 20x una membrana de nylon (Roche[®]), cargada positivamente, del mismo tamaño que el gel durante al menos 5 minutos. Asimismo se saturaron en la misma solución dos piezas de igual tamaño de papel Whatman 3MM.
- Sobre una superficie uniforme, habitualmente un cristal, se construyó una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por una pieza de papel Whatman 3MM (cuyos extremos, a modo de mecha, se mantuvieron sumergidos en un reservorio de tampón de transferencia SSC 10x), el gel, el filtro de nylon y las dos piezas restantes de papel Whatman 3MM.
- Bordeando el sistema se colocó un marco de plástico y, a continuación, se cubrió con papel absorbente. Sobre todo el conjunto se colocó una placa de vidrio y sobre ésta un peso de aprox. 0,5-1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. Una vez que el sistema estuvo perfectamente horizontal, se mantuvo la transferencia toda la noche.
- Acabado el proceso, se lavó la membrana con SSC 2x durante 5 minutos para eliminar restos de azarosa, se secó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se fijó el ADN a la membrana mediante calentamiento en vacío a 120 °C durante 30 minutos.

SOLUCIONES:

- **SSC 20x:**
 - 175,3 g de NaCl
 - 8,2 g de citrato sódico
 - 800 ml de H₂O destilada
 - Ajustar a pH 7,0 y completar hasta 1 litro.

3.13.2. MARCAJE DE SONDAS DE ADN NO RADIOACTIVAS

El marcaje de sondas de ADN se realizó empleando el sistema no radioactivo comercializado por Roche[®], siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consistió en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se mezcló el ADN molde desnaturalizado por calor (100 °C, 10 minutos) y enfriado en agua/hielo durante 2 minutos, una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante reacción inmunológica específica de la manera que se describe en el apartado siguiente.

Se empleó ADN molde (100-1000 ng) preferiblemente linearizado mediante la digestión con una enzima de restricción, en un volumen final de 20 μ l. El tiempo de incubación fue de unas 20 horas, y la temperatura de incubación de 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 μ l de una solución 0,2 M EDTA pH 8. Para precipitar el ADN marcado, se añadieron 2,5 μ l de una solución 4 M LiCl y 75 μ l de etanol absoluto preenfriado. Se mezcló por inversión manual y se dejó durante 30 minutos a - 80 °C. Se centrifugó posteriormente a 12.000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se lavó con 50 μ l de etanol 70 %. Se centrifugó a 12.000 rpm 3 minutos y se desechó el sobrenadante. El precipitado se secó al vacío y se resuspendió con 50 μ l de tampón TE durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente se conservó hasta su uso a - 20 °C.

3.13.3. HIBRIDACIÓN ADN-ADN CON SONDAS DE ADN NO RADIOACTIVAS

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

- Prehibridación: la membrana de nylon se colocó en un rodillo de hibridación y se mantuvo en 20 ml de solución de prehibridación durante al menos 1 hora, a 42 °C en un horno de hibridación (Amersham).
- Hibridación: tras eliminar la solución de prehibridación, se añadió ADN sonda previamente desnaturalizado por calor (100 °C, 10 minutos), diluido en 10 ml de solución de prehibridación y enfriado en agua/hielo durante otros 2 minutos. La membrana de nylon junto con la solución de hibridación se incubó durante al menos 6 h a 42 °C.
- Tras la hibridación se realizaron los siguientes lavados:
 - 2 x 5 minutos en 100 ml de SSC 2x; SDS 0,1%, a temperatura ambiente.
 - 2 x 15 minutos en 100 ml de SSC 0,1x; SDS 0,1%, a 68 °C.
- Se continuó con un lavado durante 1-5 minutos en tampón I a temperatura ambiente.
- La membrana se incubó durante 30 minutos en tampón II a temperatura ambiente.
- Detección inmunológica: siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche®) se incubó la membrana durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina diluidos 1:10.000 en tampón II.
- Se lavó (2 x 15 minutos) con tampón de lavado, formado por tampón I + Tween 20 0,1%.
- La membrana se introdujo en una bolsa de plástico de tamaño ligeramente superior, y

se incubó durante 5 minutos con tampón III.

- Tras el vaciado de la bolsa, se añadieron 10 ml de CSPD^{®*} (1:100 en tampón III) y se incubó 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y 10 a 15 minutos a 37 °C.
- Tras eliminar el exceso de solución se selló la bolsa conteniendo la membrana de nylon y se expuso a una película autorradiográfica en condiciones de oscuridad (Kodak X-Omat[®]). El tiempo de exposición dependió en función de la concentración de ADN, el % de homología entre los ADNs sonda y problema y la eficiencia del marcaje.
- Para el revelado de las películas se emplearon el revelador y el fijador de TETENAL[®] a las diluciones y tiempos recomendados por la casa comercial.

SOLUCIONES:

- **Solución de prehibridación:**

SSC 5x, formamida 50%

Reactivo de bloqueo 2% (p/v)

N-lauril-sarcosina 0,1%

SDS 0,02%

- **Tampón I:**

Tris-HCl 100 mM (pH 7,5)

NaCl 150 mM

- **Tampón II:**

Tampón I

Reactivo de bloqueo 1%

- **Tampón III:**

Tris-HCl 100 mM (pH 9,5)

NaCl 100 mM

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

3.14. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Como ADN molde se utilizó ADN genómico (30-50 ng), ADN plasmídico (0,05-1 µg)

o ADN de suspensiones celulares. La muestra de ADN a partir de una suspensión celular, se obtuvo directamente por recogida de células a partir de una placa o a partir de un cultivo líquido. A continuación, las células se centrifugaron a 12.000 rpm durante 3 minutos y se resuspendieron en 20 µl de agua bidestilada estéril. De la suspensión celular obtenida se emplearon 3 µl como ADN molde para la mezcla de reacción de PCR.

La mezcla de reacción consistió en MgCl₂ (1,5 mM), dNTP's (0,3 mM), tampón de PCR (10x), 50 pmoles de cada cebador, 2 unidades de Taq DNA polimerasa (BioThermTM ó Sigma-Aldrich), 0,2 unidades de pfu taq DNA polimerasa (AccuThermTM) y 30-50 ng de ADN molde para un volumen final de 50 µl.

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes:

1. Desnaturalización inicial: 94 °C 5 min.
2. 30 ciclos en las siguientes condiciones:
 - a) Desnaturalización : 94 °C 1 min
 - b) Alineamiento: 1 min a la temperatura a los oligonucleótidos utilizados como cebadores. La temperatura de esta etapa se calculó restando 2 °C sobre la temperatura de fusión (T_m) a cada oligonucleótido de acuerdo a la siguiente fórmula descrita por Sambrook *et al.*, (1999).

$$T_m = 4 \times (C + G) + 2 \times (T + A)$$
 - c) Extensión: 72 °C durante un tiempo proporcional a la longitud del fragmento amplificado en función a 1 min por cada 1 Kb.
3. Terminación: 72 °C durante 10 min, para favorecer la extensión de las cadenas parcialmente sintetizadas.

3.15. CEBADORES UTILIZADOS

En la Tabla MyM.4 se señalan los cebadores utilizados para la amplificación de los distintos fragmentos.

Tabla MyM.4. Cebadores utilizados en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA
FliF-F	5'- GGCTGGACAACAAGAGATAT- 3'
FliF-R	5'- CTCTTCGCTGATCTCGACCA - 3'

Ov-PGI-F	5'- GGTGGTCATATGAAAGCGCTTGTCGAAAAC - 3'
Ov-PGI-R2	5'- CCCGGGGCGTGCCGCCTTCAGCAGC - 3'
pPGI-F	5'- TTTCTAGATAGTTGCGATGCAAGGAGC - 3'
pPGI-R	5'- TTTGGTACCTGACCGATCACTCCGATCG - 3'
RT-SM1322-F	5'- ATCCTGTGCCTTTCCAATCCCG - 3'
SmvirB1	5'- TCTAGA GTCGACACAGGATAACCTGGCAT - 3'
SmvirB1-F	5'- TCTAGATTCAAGGCTGACGACACC - 3'
SmvirB2	5'- GAATTCAGCGTTAGCTTTTCGTGAC - 3'
Vir1	5'- TTAGAATTCAGTGCAGACGAAATCATTGC - 3'
Vir2	5'- TTAAAGCTTGTCGAGATGCAACTAGCCTC - 3'
Vir3	5'- TTAAAGCTTCTACGAAGTGATCGTAAACC - 3'
Vir4	5'- TTAGGATCCGCCTTGAGTCTGCGATCTTA - 3'
VirB5-F	5'- AGAAGGAGTGCGACCTGATG - 3'
VirB5-R	5'- GTTCTTCACCAGCATGACGA - 3'

3.16.SECUENCIACIÓN DE ADN

3.16.1. SECUENCIACIÓN DE ADN DE DOBLE CADENA

Las secuenciaciones fueron llevadas a cabo por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, (CSIC) Granada, mediante un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (300-600 ng) se le adicionó el cebador específico (1,6-3,2 pmol) y agua bidestilada hasta un volumen final de 6 μ l.

En la mayoría de los casos se secuenciaron las dos cadenas de ADN. Los cebadores empleados fueron los denominados universal y reverso, correspondientes a las secuencias del fago M13 (-40) 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' y (-20) 5'-AACAGCTATGACCATG-3' respectivamente, presentes en los vectores de tipo pUC18 y pBlueScript (KS+).

La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo en el servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, (CSIC) Granada, el servicio de Síntesis de Oligonucleotidos (Roche[®]) y el servicio Sigma Genosys (Sigma-Aldrich).

3.17.ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Para determinar el perfil proteico y como paso previo en ensayos de western blot, se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida o PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia o ausencia de SDS según fueran necesarias condiciones desnaturizantes o nativas.

3.17.1. PREPARACIÓN DE LOS GELES

Se realizó mediante la metodología propuesta por Laemmli 1970 modificada según condiciones del Departamento de Genética de la Universidad de Regensburg. Los volúmenes descritos a continuación se indican para 2 geles de 0,75 mm de espesor en el sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad). Para condiciones desnaturizantes SDS-PAGE:

GEL DE RESOLUCIÓN	15%	12,5 %	12%	10%	8%	6%
Acrilamida/Bisacrilamida (38% / 2%)	2.932 ml	2,444 ml	2.346 ml	1,955 ml	1.564 ml	1.173 ml
Agua	2,692 ml	3,181 ml	3.278 ml	3.67 ml	4.060 ml	4.451 ml
1,5 M TrisHCl pH 8,8	1,675 ml					
10% SDS	75 µl					
10% APS	50 µl					
TEMED	5 µl					

GEL DE EMPAQUETAMIENTO	4,09%
Acrilamida/Bisacrilamida (38% / 2%)	0,45 ml
Agua	3,15 ml
1,5 M TrisHCl pH 6,8	0,5 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	25 µl
TEMED	10 µl

En aquellos casos en que fue necesario realizar la electroforesis en condiciones nativas o no desnaturizantes se omitió la adición de SDS en la preparación de los geles sustituyendo su volumen por agua.

3.17.2. ELECTROFORESIS

Como tampón en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE para el sistema de electrodos en cubetas Mini-PROTEAN[®] 3 (Bio-Rad) se empleó el descrito por Laemmli (1970):

Tampón de desarrollo (5 x)

- 0,124 M Tris base (30,2 g / 2 l)
- 1,252 M glicina (188 g / 2 l)
- 0,5 % SDS (p/v) (100 ml 10% SDS)
- Añadir H₂O hasta 2 litros
- Ajustar con HCl concentrado hasta pH 8,8

Las muestras se prepararon adicionando en proporción 1:1 (v/v): tampón de carga con la siguiente composición:

Tampón de carga

- 0,01 % (p/v) azul de bromofenol
- 4 % SDS (p/v)
- Añadir tampón de la muestra hasta 10 ml

En condiciones desnaturizantes se añadió junto al volumen de tampón de carga β -mercaptoetanol como agente reductor en proporción 1:50

Tampón de la muestra (2 x)

- 1,4 ml 1,5 M TrisHCl pH 6,8
- 23 ml glicerol 87 % (p/v)
- 0,5 ml 10% SDS
- Añadir agua hasta 60 ml

En muestras en las que la electroforesis requería condiciones no desnaturizantes, se eliminó la adición del detergente SDS tanto en el tampón de desarrollo como en el tampón de la muestra y tampón de carga, sustituyendo su volumen por agua.

Las muestras así preparadas (SDS-PAGE) se desnaturizaron por ebullición

durante 10 minutos, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 segundos y se conservaron a 4 °C hasta el momento de su carga en el gel. En el caso de condiciones nativas se cargaron directamente sin hervido. El voltaje empleado fue de 150 voltios constantes a 4 °C.

Como patrón de peso molecular se empleó una preparación comercial de proteínas de amplio rango de tamaño molecular (Bio-Rad[®]) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.17.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La detección de proteínas se llevó a cabo mediante los siguientes métodos de fijación y tinción:

Tinción con Azul de Coomassie.

Tras el desarrollo de la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de etanol:ácido acético:agua en proporciones 46:45:9 junto con azul Coomassie R-250 Brilliant Blue (Bio-Rad[®]) 0,25 % donde se mantuvo durante 15 – 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. El desteñido se realizó en una solución de etanol:ácido acético:agua en proporciones 5:7:78. Para facilitar la eliminación del color azul y reducir el gasto de solución se añadió un trozo de papel secamanos que fue retirado y sustituido conforme atrapó la coloración. El proceso de desteñido se continuó hasta la completa decoloración del gel y la visualización precisa de las bandas de proteína.

Tinción con nitrato de plata

Tras el desarrollo de la electroforesis, el gel se sometió a fijación y tinción siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Blum (Blum *et al.*, 1987).

- El gel se sumergió, durante 30 minutos, con agitación suave, en 100 ml de una solución de metanol al 50 %, ácido acético al 12 % y formaldehído al 0,0185 %. Es conveniente, en esta etapa, proteger el gel de la luz.
- Posteriormente se lavó durante 10 minutos dos veces con 100 ml de etanol al 50%.
- Se pretrató durante 1 minuto con 100 ml de una solución de tiosulfato sódico 0,8 mM.
- Tras el pretratamiento se lavó tres veces durante 20 segundos con agua destilada.
- Se continuó colocando el gel durante 10 minutos en 100 ml de una solución de nitrato de plata al 0,2 % y formaldehído al 0,02775 %, en agitación suave.
- Se retiró la impregnación de plata con dos nuevos lavados de 20 segundos con agua destilada.
- Finalmente se reveló añadiendo 100 ml de una solución de carbonato sódico al 6%, formaldehído al 0,0185 % y tiosulfato sódico 16 µM. En el momento en que

aparecieron las bandas de proteínas, se lavó el gel con agua destilada e inmediatamente se añadió la solución de parada (metanol 50% y ácido acético 12%) en la que mantuvo un mínimo de 5 minutos para detener completamente el revelado.

3.17.4. CONSERVACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Para el secado de los geles de poliacrilamida tras su tinción se siguió una modificación del método descrito por Wallevik y Jensenius (1982), consistente en introducir el gel convenientemente teñido en una solución de secado compuesta por etanol al 25 % (v/v) y glicerol al 3 % (v/v) durante 1 hora. Sobre una placa de metacrilato cuadrada se depositó una hoja de papel de celofán empapado en solución de secado evitando la aparición de arrugas o burbujas. Sobre ésta se encajó un marco de metacrilato de mayor tamaño manteniendo tensa la hoja de celofán. Sobre el celofán se añadieron 10 – 20 ml de solución de secado y se colocó el gel eliminando la aparición de burbujas. Una segunda hoja de papel de celofán empapado en solución se colocó de forma cuidadosa sobre el gel, eliminando la aparición de arrugas o burbujas. Sobre todo el montaje se colocó un segundo marco de metacrilato manteniendo todo el sistema tenso. Finalmente se fijaron los bordes de ambos marcos con pinzas metálicas y se incubó a temperatura ambiente hasta llegar al completo secado del sistema (24 – 48 horas).

3.18. ESTIMACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES NATIVAS

La estimación de la masa molecular de proteínas en condiciones nativas se llevó a cabo mediante el diagrama de Ferguson, siguiendo la modificación descrita por Hedrick y Smith, (Hedrick & Smith, 1968). Para ello, se desarrollaron muestras de proteína problema y albúmina sérica bovina en geles nativos de poliacrilamida-bisacrilamida a diferentes porcentajes. Tras el desarrollo del gel en el tampón de desarrollo y voltaje adecuado según el apartado 3.16.2, los geles se tiñeron con azul de Coomassie tal y como se describe en el apartado 3.16.3. Se determinó la movilidad relativa de las distintas bandas de proteínas aparecidas tanto en la muestra problema como en la muestra patrón de albúmina sérica bovina. La movilidad relativa (R_f) se calculó como la distancia de migración de la proteína frente a la distancia total del gel. Se representó en el eje de ordenadas (Y) el valor $100 \times \log(R_f \times 100)$ y en el eje de abscisas (X) el % de poliacrilamida utilizada para cada una de las formas moleculares obtenidas. Se calculó mediante regresión lineal las ecuaciones de la recta obtenidas para los distintos puntos representados. El valor de log de la pendiente de cada una de las rectas obtenidas se representó en una nueva gráfica frente al peso en Daltons conocido

de las 4 isoformas que presenta de forma nativa la albúmina sérica bovina. Tras la elaboración mediante regresión lineal de la ecuación de la recta correspondiente a los distintos puntos, la masa molecular de la proteína problema se calculó mediante interpolación del valor del logaritmo de la pendiente obtenida.

3.19. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF

Tras la electroforesis de proteínas según la metodología descrita anteriormente las proteínas se transfirieron a filtros BioTRace PVDF de 0,45 μm de poro (Pall Corporation) mediante el sistema Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Previamente a la transferencia la membrana de PVDF se lavó en metanol al 100 % durante 1 minuto para reducir la hidrofobicidad. Tanto el gel como la membrana se equilibraron en agitación suave durante 15 -30 minutos en tampón de transferencia compuesto por 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina, 20 % metanol. A continuación y sobre un casete de transferencia se dispuso el siguiente orden de montaje: esponja y papel Whatman 3MM empapados en tampón de transferencia. Sobre éstos, se colocó el gel de poliacrilamida previamente equilibrado. Sobre él, se colocó la membrana de PVDF equilibrada eliminando las posibles burbujas formadas y finalmente, otro papel Whatman y esponja empapados en tampón de transferencia. El montaje así formado se introdujo sobre el módulo de electrodos siguiendo la orientación recomendada por el fabricante. El módulo de electrodos conteniendo la unidad de montaje se introdujo en una cubeta de electroforesis con tampón de transferencia. La transferencia se llevó a cabo aplicando una intensidad de 100 V constantes durante 70 minutos a 4 °C. Para comprobar la completa transferencia de proteínas, la membrana de PVDF se tiñó con una solución al 0,5% (p/v) de Rojo Ponceau (Ponceau S, SIGMA[®]), en ácido acético 2% (v/v) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron destiñendo con agua destilada, hasta alcanzar el contraste adecuado. La tinción fue totalmente eliminada con sucesivos lavados de agua destilada.

3.20. REVELADO INMUNOLÓGICO

La membrana de PVDF conteniendo las proteínas transferidas, se sometió al bloqueo de sitios inespecíficos de unión al anticuerpo mediante incubación durante 2 horas, con agitación suave a temperatura ambiente, en una solución que contenía leche desnatada en polvo al 5% en tampón PBS. Posteriormente se lavó la membrana varias veces con tampón PBS 0,1% Tween 20 (PBST). Tras este paso se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación suave con una dilución 1/100 (10 ml) en tampón PBST con antiseros purificados

anti-PGI. Tras la incubación se eliminó el exceso de anticuerpos con varios lavados con PBST y finalmente un último lavado de 5 minutos. A continuación, la membrana fue incubada 2 h a temperatura ambiente, con una dilución 1/50.000 (50 ml) en tampón PBST de anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con peroxidasa de rábano (SIGMA[®]). Se lavó la membrana varias veces con PBST para eliminar el exceso de anticuerpos secundarios y finalmente durante 5 minutos en tampón PBS. Se preparó solución de revelado y en oscuridad se añadieron 3,2 µl de H₂O₂ (30%). La membrana se dispuso sobre un vidrio y se bañó mediante la ayuda de una pipeta en solución e inmediatamente se dispuso sobre un casete de fotografía. Sobre ésta se colocó una película autoradiográfica (Kodak X-Omat[®]) y se expuso (5 - 15 minutos) para la impresión de ésta. Transcurrido este tiempo se reveló la película fotográfica mediante el revelador y el fijador de TETENAL[®] a las diluciones y tiempos recomendados por la casa comercial.

Soluciones

PBS (phosphate-buffer saline)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O

1,76 mM KH₂PO₄

pH 7,2

Solución de revelado

8 mg de luminol en 20 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 8,6 con NaCl 150 mM, 200 µl de 4-yodofenol 1% (p/v) en DMSO.

3.21. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS SECRETADAS EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE *S. meliloti*

El aislamiento de proteínas secretadas en los sobrenadantes de cultivos de *S. meliloti* se llevó a cabo mediante el método descrito por Ellermeier y Slauch (2003).

- Se crecieron preinóculos de las cepas a estudio en medio TY con los correspondientes antibióticos hasta alcanzar la fase estacionaria ($DO_{600} = 1,2 - 1,4$).
- Los preinóculos se diluyeron en 10 ml de medio TY hasta alcanzar la fase estacionaria ($DO_{600} = 1,2 - 1,4$). En el caso de cultivos crecidos en medio mínimo, los preinóculos fueron lavados dos veces en medio mínimo. Cuando fue necesaria la presencia de

luteolina se adicionó en una concentración 5 μ M disuelta en metanol al 100 %.

- Se centrifugaron los 10 ml de cultivo a 5000 x g durante 10 minutos a 4 °C.
- Se tomaron los sobrenadantes y se pasaron por unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 μ m de tamaño de poro.
- Las proteínas se precipitaron con la adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 100 % preenfriado y la incubación en hielo durante 30 minutos.
- Los tubos se centrifugaron a 15.000 x g durante 30 minutos a 4 °C.
- Se desecharon los sobrenadantes.
- El precipitado se lavó con 5 ml de acetona preenfriada.
- Los tubos se centrifugaron a 15.000 x g durante 20 minutos a 4 °C.
- Se desecharon los sobrenadantes y el precipitado se desecó al aire a temperatura ambiente.
- Finalmente los precipitados se resuspendieron en 50 μ l de 50 mM TrisHCl pH 8 y 40 μ l de solución tampón de muestra (2 x) del apartado 3.16.2
- Las muestras fueron sometidas a análisis mediante electroforesis y teñidas, siguiendo los apartados 3.16.2 y 3.16.3 respectivamente.

3.22. SOBRE-EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SMc02163 DE *S. meliloti*.

Para la sobre-expresión de la proteína SMc02163 se empleó el sistema IMPACT[™] – CN (New England BioLabs[®]) en el cual el gen a expresar se coloca bajo el control del promotor T7-operador *lac* en el vector de expresión (pTYB2). El sistema se mantiene reprimido mediante la síntesis del represor del operón *lac* por el propio vector. La sobre-expresión del sistema se lleva a cabo en la cepa de *E. coli* (ER2566) que presenta una copia de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lac*. De este modo, en presencia de IPTG como inductor del operón *lac*, se libera la represión de todo el sistema obteniendo grandes cantidades de proteína. El sistema IMPACT[™] – CN (New England BioLabs[®]) presenta frente a los sistemas de expresión de proteínas recombinantes conocidos comúnmente como “His-Tag” o colas de histidinas, la característica de producir la liberación de la proteína recombinante sin colas adicionales. Para ello, adyacente a la zona de expresión, el vector presenta una región que codifica un motivo autoescindible denominado inteína. Junto a ésta, se encuentra unida una región que codifica un motivo de unión a quitina que facilita la purificación de la proteína recombinante. La producción de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante el cultivo de las células de *E. coli* ER2566

conteniendo la construcción en el vector pTYB2, en 2 litros de medio LB con ampicilina a 37 °C en agitación. Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 0,6 - 0,7$ se llevó a cabo la inducción con IPTG a una concentración final de 0,3 mM continuando la incubación durante 16 horas a 18 °C. Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C y se resuspendieron en 30 ml de tampón IMPACT (20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) adicionado de 10 µg/ml de DNase I. La rotura celular se realizó mediante cuatro pases a 20.000 PSI a través de prensa de French (French® Pressure Cells Press, Sim-Aminco®). Se centrifugó 30 minutos a 20.000 rpm a 4 °C para eliminar los restos de celulares. El sobrenadante se cargó lentamente a una tasa de 0,5 ml/ minuto en una columna tipo C (GE Healthcare) conteniendo una matriz de quitina (New England Biolabs) que previamente había sido equilibrada y lavada con tampón IMPACT a 4 °C. La unión de la proteína recombinante presente en el sobrenadante es rápida a través del dominio de unión a quitina, a la matriz presente en la columna. Tras dos lavados con buffer IMPACT para eliminar proteína no específicamente unida, se llevó a cabo la liberación de la proteína recombinante mediante el corte en la zona autoescindible de ínteína. Para ello, se añadieron dos volúmenes de tampón IMPACT conteniendo DTT 50 mM y se incubó la columna 48 horas a 4 °C. La proteínas fueron eluidas con tampón IMPACT en distintas fracciones (3 ml/ fracción). Para confirmar el proceso de rotura, 10 µl de cada fracción se analizaron en geles SDS-PAGE. Las fracciones conteniendo la proteína recombinante fueron unidas y dializadas durante 24 horas a 4 °C en tampón PBS pH 7,5 con varios cambios de tampón PBS. Se concentró la muestra mediante ultrafiltración y centrifugación a través de una unidad Centricón C-10 (Amicon®) sobre una membrana de celulosa de 10 KDa de tamaño de poro. La muestra concentrada fue purificada mediante filtración en gel a través de FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) usando una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón PBS. Las alícuotas cuyas absorbancia a 280 nm representaron valores superiores al valor umbral, fueron analizadas en geles SDS-PAGE para confirmar la presencia de proteína. Finalmente aquellas fracciones conteniendo mayores cantidades de proteína, fueron combinadas y concentradas mediante ultrafiltración y centrifugación a través de una unidad Centricon C-10 (Amicon®) sobre membrana de celulosa de 10 KDa de tamaño de poro.

3.23.OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

La obtención de sueros preinmunes así como sueros inmunes con anticuerpos policlonales frente a la proteína SMc02163 purificada, se realizó mediante el servicio de la empresa Pineda Antibody Service (Berlín, Alemania). La obtención de anticuerpos

policlonales purificados frente a la proteína SMc02163 desde antisueros totales se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Scharf *et al.*, (2001) a través del diferente grado de afinidad de los anticuerpos a la proteína. Para ello, diversas muestras conteniendo 50 µg de proteína fueron desarrolladas en un gel SDS-PAGE al 10% y posteriormente transferidas a una membrana de PVDF. Tras la tinción de la membrana con solución Rojo Ponceau se recortaron las bandas correspondientes a la proteína SMc02163. Los fragmentos se introdujeron en tubos de microfuga conteniendo 2 ml de suero policlonal crudo y se incubaron en agitación a 4 °C durante toda la noche. Los fragmentos se lavaron 3 veces con una solución PBS – 0,1% BSA (albúmina sérica bovina), 2 veces en una solución PBS – 0,1% BSA – 0,1% Nonidet P-40 y 3 veces con una solución PBS – 0,1% BSA cada uno durante 5 minutos. La separación de los anticuerpos de la membrana se realizó lavando la membrana con 750 µl de una solución 0,2 M Glicina/HCl pH 2,5 durante 1 minuto en agitación. El sobrenadante fue inmediatamente añadido a 375 µl de una solución 1 M KH₂PO₄ – K₂HPO₄ x 3 H₂O (pH 9) preenfriada en hielo. El proceso de lavado de anticuerpos se repitió una segunda vez. El conjunto de ambas separaciones se dializó al menos dos veces en tampón PBS a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente los anticuerpos fueron alicuotados y reservados a – 20 °C hasta su uso.

3.24. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA

El método de transducción generalizada consistió en la transferencia genética de fragmentos de ADN genómico de una bacteria donadora a una receptora mediante el concurso de fagos. En *S. meliloti* se siguió el método descrito por Finan *et al.*, (1984):

- Inicialmente para obtener fagos que porten la región génica de la bacteria donadora o “pseudovirión”, se creció en medio TY un cultivo bacteriano hasta alcanzar la fase logarítmica ($DO_{600} = 0,4 - 0,5$).
- En un tubo de ensayo se mezclaron 0,1 ml del cultivo bacteriano, 5 ml de medio TY 0,5 % agar fundido adicionado de 2,5 mM de MgSO₄ y 80 -100 µl de una solución de fagos φM12, suministrado por el Dr. Michael Hynes (Univ. Calgary. Canadá), con una título de $10^9 - 10^{10}$ pfu/ml.
- La mezcla se agitó con vórtex y se añadió sobre una placa solidificada de medio TY, y se incubó a 28 °C durante 24 horas.
- Transcurrido este tiempo, se añadió sobre la placa, que contenía las calvas de lisis, 3 ml de TY adicionado de 2,5 mM de MgSO₄ y se incubó a 4 °C durante 2- 4 horas.
- Se tomó el medio líquido conteniendo el lisado de fagos con una jeringa estéril y se

filtró a un nuevo tubo mediante unidades de filtración Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 μm de diámetro de poro.

- Se creció el cultivo bacteriano receptor hasta fase logarítmica $\text{DO}_{600} = 0,8 - 0,9$ ($10^8 - 10^9$ cfu/ml) en medio TY adicionado de 2,5 mM de MgSO_4 .
- Se infectó con una proporción 1:1 de células y fagos, mezclándose 1 ml del cultivo bacteriano y 1 ml del lisado de fagos. Se incubó 20 minutos a 30 °C en agitación.
- La mezcla se centrifugó y se retiró el sobrenadante.
- El precipitado se lavó dos veces con medio LB para eliminar las partículas virásicas y se sembraron finalmente en medio LB con los antibióticos correspondientes, hasta obtener las colonias transductantes.

3.25. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE FAGOS

Para determinar el número de fagos presentes en solución se creció un cultivo bacteriano en medio rico TY hasta alcanzar la fase logarítmica tardía ($\text{DO}_{600} = 0,9 - 1,1$). Se infectó el cultivo con diferentes diluciones de la solución de fagos a determinar mediante la siguiente mezcla: 100 μl de cultivo bacteriano, 100 μl de la dilución de fagos y 5 ml de TY 0,5 % agar fundido adicionado de 2,5 mM de MgSO_4 . Se mezcló mediante vórtex y se añadió sobre una placa de medio TY solidificada. Se incubaron a 28 °C durante 24 horas y se realizaron recuentos de las calvas de lisis aparecidas. Finalmente, y tras aplicar la corrección por el factor de dilución usado, el título de fagos presentes se expresó como pfu (plaque forming units)/ml.

4. ENSAYOS CON PLANTAS

4.1. ESTERILIZACIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas de *M. sativa* fueron sumergidas en una solución de HgCl_2 al 2,5% durante 10 minutos en agitación. En condiciones de esterilidad, se lavaron 5 a 6 veces abundantemente con agua destilada estéril para posteriormente mantenerlas en imbibición durante 1 – 2 horas también en agua destilada estéril. Seguidamente a la imbibición se lavaron finalmente de 2 a 3 veces con agua destilada estéril y se colocaron en placas petri estériles conteniendo discos de papel de filtro estériles humedecidos con agua destilada estéril. Se germinaron en oscuridad a 28 °C hasta que las plántulas alcanzaron una longitud de unos 10 mm.

Las semillas de *M. truncatula* fueron inicialmente escarificadas mediante una

incubación de 4 a 5 minutos en una solución de ácido sulfúrico concentrado. En condiciones de esterilidad, se retiró la solución ácida y se lavó 3 – 4 veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en una solución de lejía comercial durante 2 minutos para su completa esterilización. Tras este tiempo se lavaron repetidamente con agua destilada estéril y se colocaron sobre placas de agar-H₂O 0,8 % (p/v) estéril. Finalmente se incubaron a 13 °C en oscuridad durante 48 – 72 horas hasta que las plántulas alcanzaron una longitud de unos 10 mm.

Las semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*) fueron sumergidas en una solución de HgCl₂ al 0,2 % (p/v) en agua destilada durante 3 minutos en agitación. En condiciones de esterilidad se lavaron 5 ó 6 veces con agua destilada estéril. Se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 30 % durante 3 minutos y se lavaron repetidamente con agua destilada estéril. Las semillas se sometieron a imbibición con agua destilada estéril durante 4 horas a temperatura ambiente en oscuridad, con un cambio de agua destilada estéril a las 2 horas. Finalmente, se colocaron sobre placas de vidrio conteniendo vermiculita estéril por autoclave. Se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 72 -96 horas hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño de 1 – 2 cm.

Las semillas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) fueron inicialmente escarificadas mediante una incubación de 30 - 40 minutos en una solución de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). En condiciones de esterilidad, se retiró la solución ácida y se lavó 3 – 4 veces con agua destilada estéril. Las semillas se sumergieron en una solución de lejía comercial durante 5 minutos para su completa esterilización. Tras este tiempo se lavaron repetidamente con agua destilada estéril y se colocaron sobre placas de agar-H₂O al 0,8 % (p/v) estéril por autoclave. Se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 24 – 48 horas hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño de 1 -2 cm.

Las semillas de veza (*Vicia sativa*) fueron sumergidas en etanol al 100 % durante 2 minutos en agitación. En condiciones de esterilidad se retiró la solución y se lavó repetidamente con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en lejía comercial durante 7 minutos. Se lavaron repetidamente con agua destilada estéril y se colocaron en imbibición con agua destilada estéril durante 8 – 10 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se lavó repetidamente con agua destilada estéril y se colocaron en placas con papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 36 – 48 horas hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño de 1 -2 cm.

Las semillas de guisante (*Pisum sativum*) fueron sumergidas en una solución de

lejía comercial durante 15 minutos en agitación. En condiciones de esterilidad se retiró la solución y se lavó repetidamente con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 7 % durante 15 minutos. Se lavaron abundantemente con agua destilada estéril y se sometieron a imbibición durante 2 horas en agua destilada estéril. Finalmente las semillas se colocaron sobre placas de vidrio conteniendo papel de filtro estéril humedecido. Se incubaron a 28 °C durante 36 – 48 horas hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño de 1 – 2 cm.

Las semillas de judía (*Phaseolus vulgaris*) utilizadas fueron sumergidas en una solución al 50 % de lejía comercial en agua estéril (v/v) durante 5 minutos con agitación manual. En condiciones de esterilidad se retiró la solución y se lavaron repetidamente las semillas con agua destilada estéril. Se dejaron en imbibición en agua destilada estéril durante 4 – 5 horas a temperatura ambiente. Tras ese tiempo se colocaron en condiciones de esterilidad sobre placas de vidrio conteniendo vermiculita esterilizada por autoclave. Se incubaron a 28 °C durante 72 – 96 horas hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño de 1 – 2 cm.

Las semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) utilizadas fueron sumergidas en una solución de lejía comercial al 50 % durante 15 minutos en agitación. En condiciones de esterilidad, se lavaron repetidamente con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 7 % durante 15 minutos. Se lavaron repetidamente con agua destilada estéril, para posteriormente someterlas a imbibición durante 1 hora y 30 minutos en agua destilada estéril. Tras ese tiempo se colocaron en esterilidad sobre placas de agar-H₂O al 0,8 % (p/v) estéril. Se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 4 - 5 días hasta que las plántulas alcanzaron un tamaño de 0,5 – 1 cm.

4.2. SOLUCIÓN NUTRITIVA PARA PLANTAS

Se ha empleado una solución mineral derivada de la descrita por Rigaud y Puppo (1975), cuya composición se describe a continuación:

- **Macroelementos (por litro de agua):**

KH₂PO₄, 68 mg

K₂HPO₄, 44 mg

SO₄Mg·7H₂O, 123 mg

K₂SO₄, 174 mg

SO₄Ca, 173 mg

EDTA Férrico (Secuestrene), 50 mg

• **Microelementos (por litro de agua):**

MoO₄Na₂·2H₂O, 0,11 mg

BO₃H₃, 2,85 mg

SO₄Mn·4H₂O, 3,07 mg

SO₄Zn·7H₂O, 0,55 mg

SO₄Cu·5H₂O, 0,2 mg.

El pH de la solución se ajustó a 7,5. La solución se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

4.3. REAISLAMIENTO DE *Rhizobium* DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Se tomaron los nódulos de la planta y se esterizaron en superficie mediante HgCl al 0,25 % durante 5 minutos. Seguidamente se lavaron con agua estéril 5 ó 6 veces y se trituraron individualmente en condiciones asépticas con una varilla de vidrio previamente esterilizada. Una gota del triturado se extendió sobre placas de medio TY adicionado de los correspondientes antibióticos, y se incubaron a 28 °C durante 4 ó 5 días.

4.4. ENSAYO DE ADSORCIÓN DE *Rhizobium* A RAÍCES DE ALFALFA

Se siguió la metodología descrita por Anollés y Favelukes (1986) con algunas modificaciones de Soto *et al.*, (2004).

- Se esterizaron semillas de alfalfa según se indica en el apartado 4.1. Se transfirieron una vez germinadas a placas de agar-H₂O al 1,15% (p/v), y se mantuvieron verticalmente durante 24 horas en cámara de cultivo de plantas bajo las condiciones descritas en el apartado 4.6.
- Se crecieron preinóculos de las cepas a estudiar en medio TY con los correspondientes antibióticos hasta fase estacionaria y se diluyeron en medio mínimo con los correspondientes antibióticos hasta una DO₆₀₀ = 0,4.
- Los cultivos se diluyeron nuevamente en matraces conteniendo 10 ml de solución nutritiva de plantas estéril hasta una concentración del orden de 10³ a 10⁵ cfu/ml, determinadas mediante recuento en placa.
- A continuación se transfirieron 15 plantas a esta solución y se mantuvo en agitación a 200 rpm durante 4 horas a 25 °C.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tras la incubación se eliminó la solución en condiciones de esterilidad y se lavaron las plantas 4 veces de la siguiente forma: se añadieron 10 ml de solución nutritiva estéril, se agitó a 120 rpm durante 1 min y se eliminó la solución.
- Tras los lavados se colocaron las raíces en placas con una base de medio TY adicionado de cicloheximida 25 µg/ml y Rojo Congo 0,0025 % (p/v) así como los correspondientes antibióticos para cada cepa.
- Las placas se cubrieron con una sobrecapa de TY 0,7 % agar (p/v) adicionado de cicloheximida 25 µg/ml y Rojo Congo 0,0025 % (p/v) así como los correspondientes antibióticos para cada cepa.
- Las placas se incubaron a 28 °C durante 3 días post-inoculación.
- Mediante el uso de lupa binocular se realizó el conteo de colonias bacterianas íntimamente asociadas a la raíz.

El número total de bacterias (m) que son adsorbidas en la planta se calculó según la siguiente fórmula:

$$m = f \times b$$

Donde,

$$f = 1,064 + (4,304 \times 10^{-3}) b - (2,671 \times 10^{-5}) b^2$$

b = número de colonias cuantificadas

El porcentaje de adsorción se determinó como:

$$\%A = 100 \times \frac{m}{n}$$

Donde,

n = número de colonias en el inóculo

El error para el 95% del intervalo de confianza del porcentaje de adsorción se calculó como:

$$E = 1,96 \times A \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right)^{1/2}$$

4.5. ENSAYO DE COLONIZACIÓN DE *Rhizobium* A RAÍCES DE ALFALFA

Se siguió una modificación de la metodología descrita por Jiménez-Zurdo *et al.*,

(1997).

- Se esterilizaron semillas de alfalfa según se indica en el apartado 4.1. Se transfirieron una vez germinadas a placas de agar-H₂O al 1,15% (p/v), y se mantuvieron verticalmente durante 24 horas en cámara de cultivo de plantas las condiciones descritas en el apartado 4.6.
- Se crecieron preinóculos de las cepas a estudio en medio TY con los correspondientes antibióticos hasta fase estacionaria y se diluyeron en medio mínimo con los correspondientes antibióticos hasta una DO₆₀₀ = 0,4.
- Los cultivos se diluyeron nuevamente en matraces conteniendo 10 ml de solución nutritiva de plantas estéril hasta una concentración del orden de 10³ a 10⁵ cfu/ml, determinadas mediante recuento en placa. En los ensayos presentados en esta Tesis Doctoral se procedió finalmente con una concentración de 10⁵ cfu/ml.
- A continuación se transfirieron 15 plantas a esta solución y se mantuvo en agitación a 200 rpm durante 4 horas a 25 °C.
- Tras la incubación se eliminó la solución en condiciones de esterilidad y se lavaron las plántulas 4 veces de la siguiente forma: se añadieron 10 ml de solución nutritiva estéril, se agitó a 120 rpm durante 1 min y se eliminó la solución.
- Las plántulas lavadas se colocaron en placas conteniendo solución nutritiva (apartado 4.2) con agar purificado al 1,15%.
- Bacterias asociadas a la raíz se determinaron a las 2, 24 y 48 horas de la siguiente manera:
 - o 5 grupos conteniendo 3 raíces cada uno se introdujeron en tubos de microfuga con 1 ml de agua estéril
 - o Las raíces fueron lavadas 4 veces con agua destilada y finalmente se añadió 1 ml de una solución 2 mM de EDTA estéril.
 - o Se sonicaron los tubos en baño de ultrasonidos durante 1 minuto.
 - o Los rizobios liberados fueron determinados mediante recuento en placa con medio TY adicionado de los correspondientes antibióticos.

4.6. CULTIVO DE PLANTAS

4.6.1. CULTIVO AXÉNICO DE TUBOS

El cultivo axénico de plantas de alfalfa se realizó según la técnica descrita por Olivares *et al.*, (1980). Previamente se esterilizaron mediante autoclavado a 120 °C durante 20

minutos tubos de 20 x 200 mm conteniendo un soporte de papel de filtro y 10 ml de solución mineral de Rigaud y Puppo modificada. Cuando las plántulas de alfalfa recién germinadas alcanzaron aproximadamente 1 cm de longitud, se colocaron en condiciones asépticas en los tubos (1 planta/tubo). Se dejaron los tubos con las plantas en oscuridad durante dos días. Para evitar que la luz incidiera directamente sobre las raíces, los tubos se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas, mantenida en las siguientes condiciones: $500 \mu\text{einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (longitud de onda: 400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 23/17 °C de temperatura día/noche y 50 % de humedad relativa.

Cuando las plantas tuvieron 7 - 10 días, se inocularon con 1 ml de una suspensión de aproximadamente 10^7 células/ml de la cepa a estudio, así como un control no inoculado.

4.6.2. CULTIVO EN JARRAS LEONARD

El cultivo se llevó a cabo utilizando jarras Leonard (Leonard, 1943). Para ello, se relleno el recipiente superior con vermiculita y el inferior con solución mineral de Rigaud y Puppo modificada y se esterilizaron mediante autoclavado a 120 °C durante 20 minutos. En cada jarra se sembraron semillas esterilizadas y germinadas, y se inocularon con 1 ml de una suspensión $10^8 - 10^9$ cels/ml de la cepa a estudio, así como un control no inoculado. Una vez inoculadas, las jarras se cubrieron con una capa de perlita estéril que evita la posible contaminación ambiental y refleja la luz, evitando un calentamiento excesivo de las semillas que pudiera alterar el desarrollo de las mismas. La juntura entre el componente superior e inferior de la jarra se selló con papel parafilm y las jarras se envolvieron en papel opaco a la luz para evitar que ésta alcanzara las raíces.

Las jarras se trasladaron a cámara de cultivo de plantas mantenida en las condiciones del apartado 4.6.1.

4.6.3. MEDIDA DEL GRADO DE INFECTIVIDAD

Tras la inoculación de 24 tubos de cultivo axénico de las cepas en estudio, el grado de infectividad se determinó mediante el registro diario del número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta, considerando como planta nodulada aquella en la que existe al menos un nódulo visible sobre la raíz. La infectividad de cada cepa se considera como la representación del número de nódulos formados en función al tiempo de nodulación.

En el caso de cultivos en jarras Leonard, el grado de infectividad de las cepas a estudio se determinó mediante el recuento total de nódulos o pseudonódulos a los 25 – 30 días de la inoculación.

4.6.4. MEDIDA DEL GRADO DE COMPETITIVIDAD

Para medir el grado de competitividad, se inocularon 12 tubos con plantas que tenían entre 7 y 10 días, con 1 ml de una suspensión celular que contenía una mezcla 1:1 de la cepa a estudiar frente a una cepa marcada con el gen informador *gusA* (pGUS3). Ambas cepas a una concentración final de 10^6 células/ml. Tras la inoculación se mantuvieron por un período de 15 días en cámara de cultivo de plantas en las condiciones anteriormente señaladas. Transcurrido este tiempo, las raíces de plantas noduladas fueron lavadas en agua destilada e incubadas sumergidas durante 24 horas a 37 °C en una solución 1 mM X-gluc (5-bromo-4-cloro-3 indolil- β -D-glucuronido), 50 mM de tampón fosfato sódico pH 7,5 con 1% SDS. Los nódulos ocupados con la cepa pGUS3 mostraron tinción azulada frente a nódulos blancos ocupados por la cepa a estudio. El grado de competitividad se calculó como el porcentaje de nódulos azules frente a los ocupados por la cepa a estudio. El error estadístico se calculó según la siguiente fórmula:

$$E = 1,96 \sqrt{\frac{P(1-P)}{N}} \times 100$$

Donde,

E = error estadístico

P = porcentaje en tanto por 1 de nódulos ocupados

N = número total de nódulos del experimento

4.6.5. MEDIDA DEL PESO SECO DE LA PARTE AÉREA

El peso seco de la parte aérea de las plantas se determinó después de 30 - 35 días de la inoculación. Para ello, se cortó la parte aérea y se secó en horno a 65 °C durante 2 días para asegurar la completa desecación. Finalmente las plantas fueron pesadas en una balanza de precisión.

4.6.6. CULTIVO EN MACETAS DE PLANTAS DE TOMATE

El cultivo de plantas de tomate se llevó a cabo en macetas de 2 Kg de capacidad en cuyo fondo se colocó un papel de filtro cortado a medida. Se preparó arena y vermiculita

lavada y se mezcló con una mezcla de suelo y turba vegetal en la proporción 1:1:1:1. La mezcla se repartió en macetas que fueron autoclavadas a 120 °C durante 20 minutos. Las semillas esterilizadas y germinadas se colocaron en las macetas en condiciones de esterilidad con pinzas estériles. Las macetas se mantuvieron en cámara de plantas con las condiciones de temperatura, humedad relativa y ciclo de luz día/noche del apartado 4.6.1.

4.7. AISLAMIENTO DE FRACCIÓN BACTEROIDAL

Para el aislamiento de la fracción bacteroidal de nódulos de alfalfa se siguió el siguiente protocolo:

- Se recogieron de 0,5 – 1,5 g de nódulos de alfalfa.
- Se colocaron en un homogeneizador de 20 ml previamente enfriado en hielo.
- Se añadió 1 ml de tampón Dixon preenfriado en hielo con 1/3 del peso fresco de los nódulos de PVPP (polivinilpirrolidona).
- Tras homogeneizar se aumentó el volumen con 3 ml de tampón Dixon. Se pasaron los 4 ml a un tubo de centrifuga.
- Se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo que se reservó en hielo.
- Se resuspendió el precipitado nuevamente con 3 ml de tampón Dixon y se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C.
- Se recogió el sobrenadante y se unió con el que previamente estaba reservado en hielo.
- Se centrifugó a 6.000 rpm durante 7-8 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- El precipitado se lavó nuevamente con 7 ml de tampón Dixon y se centrifugó a 6.000 rpm durante 7 - 8 minutos a 4 °C.
- Tras retirar el sobrenadante el precipitado se resuspendió en 2 ml de tampón Dixon.
- En un tubo de policarbonato se preparó la siguiente mezcla: 7 ml de percoll + 1 ml de (10X) tampón Dixon + 2 ml conteniendo el precipitado. Los componentes del tubo se mezclaron por inversión.
- Se centrifugaron los tubos a 38.000 – 40.000 x g durante 45 - 60 minutos con rotor angular a 4 °C.
- Tras la centrifugación el gradiente permitió visualizar una banda parduzca correspondiente a los simbiosomas. Se eliminó la parte superior de la mezcla con una pipeta de 1 ml cuidadosamente hasta la banda parduzca.
- Con una jeringa y de forma cuidadosa se tomó la banda conteniendo los simbiosomas y se pasó a un nuevo tubo.

- Para eliminar los restos de percoll, se añadieron 9 ml de tampón Dixon.
- Se centrifugó a 12.000 rpm durante 7 minutos a 4 °C.
- Se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se repitió nuevamente el lavado del precipitado con 9 ml de tampón Dixon.
- Tras 2-3 lavados, el precipitado se resuspendió en aproximadamente 1 ml de tampón Dixon.
- Para romper los simbiosomas y liberar así los bacteroides se sometió la mezcla durante 2- 3 minutos a vortex a máxima velocidad.
- Se centrifugó a 12.000 rpm durante 7 minutos a 4 °C para precipitar los bacteroides y se eliminó el sobrenadante. El precipitado nuevamente se lavó en tampón Dixon y se centrifugó para precipitar los bacteroides.
- El precipitado conteniendo la suspensión bacteroidal se resuspendió finalmente en un volumen de tampón Dixon adecuado.

La composición del tampón Dixon consistió en:

5,7 g/l K₂HPO₄

3,4 g/l KH₂PO₄

0,5 g/l Cl₂Mg

El pH se ajustó a 7 con KOH.

4.8. ENSAYO DE TUMOROGÉNESIS EN PLANTAS DE TOMATE

Se siguió el método descrito por Hooykaas *et al.*, (1977) modificado para plantas de tomate. Se crecieron las cepas de *Agrobacterium* a estudio hasta fase logarítmica en medio LB con los correspondientes antibióticos. Se lavaron tres veces con una solución 0,9 % de NaCl y finalmente se diluyeron en la misma solución hasta DO₆₆₀ = 1.0. Los tallos de plantas de tomate de 3 – 4 semanas de crecimiento se punzaron con un palillo de dientes estéril en la zona cercana al haz apical y se inocularon 20 µl de cultivo por herida. Los resultados del desarrollo del tumor fueron visibles en 2 – 3 semanas.

4.9. TINCIÓN DE ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA IN PLANTA

Para la determinación de la actividad β-galactosidasa *in planta* se siguió la metodología propuesta por Boivin *et al.*, (1990).

4.9.1. DETECCIÓN EN RAÍCES DE ALFALFA

- Se esterilizaron y germinaron semillas como se describe en el apartado 4.1.

- Las semillas germinadas fueron colocadas en placas solidificadas conteniendo solución nutritiva para plantas (apartado 4.2) y agar purificado al 1,15% (p/v) y se mantuvieron verticalmente durante 48 horas en cámara de cultivo de plantas bajo las condiciones descritas en el apartado 4.6.1.
- Se crecieron preinóculos de las cepas a estudio en medio TY con los correspondientes antibióticos hasta $DO_{600} = 1$. Se tomó 1 ml de cultivo se lavó con un volumen de $MgSO_4$ 10 mM (estéril) para finalmente resuspenderlo en 100 μ l de la misma solución.
- Se inocularon 2 μ l de la solución bacteriana en la parte más apical de las raíces pregerminadas en placas y se incubaron las plantas por un período de 2 a 3 días en cámara de plantas con las condiciones anteriormente descritas.
- Raíces de plantas inoculadas fueron posteriormente cortadas y fijadas mediante dos desgasificaciones por bomba de vacío de 15 minutos en una solución de glutaraldehído 1,25% en 0,2 M de cacodilato sódico pH 7,2 y posterior incubación en ausencia de vacío durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Las raíces fueron posteriormente lavadas 3 veces durante 10 minutos cada vez con tampón cacodilato sódico 0,2 M pH 7,2.
- La tinción se llevó a cabo a 37 °C durante 12 - 15 horas en la siguiente solución: 800 μ l de tampón cacodilato sódico 0,2 M pH 7,2 , 50 μ l de una solución 100 mM de rojo prusiato ($K_3[Fe(CN)_6]$), 50 μ l de una solución 100 mM de amarillo prusiato ($K_4[Fe(CN)_6]$) y 40 μ l de una solución de X-Gal al 2 % en dimetilformamida.
- La solución de tinción se eliminó mediante tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón cacodilato sódico 0,2 M pH 7,2
- Seguidamente se lavaron dos veces 5 minutos cada vez con agua destilada.
- Las raíces se colocaron en portaobjetos y visualizadas bajo el microscopio.

4.9.2. DETECCIÓN EN SECCIONES DE NÓDULOS

- Se esterilizaron y germinaron semillas de alfalfa y cultivaron en tubos según se describe en el apartado 4.6.1.
- Los nódulos inducidos por las distintas cepas a estudio fueron cortados de las raíces y fijados mediante dos desgasificaciones con bomba de vacío de 15 minutos cada una y posterior incubación a temperatura ambiente sin vacío en una solución de glutaraldehído 1,25% en 0,2 M de cacodilato sódico pH 7,2.
- Los nódulos fueron posteriormente lavados 3 veces durante 10 minutos cada vez con tampón cacodilato sódico 0,2 M pH 7,2.

- Una vez fijados y lavados, se obtuvieron secciones de 80 μm de grosor mediante vibratomo.
- Las secciones obtenidas se tiñeron a 37 °C durante 12 - 15 horas en la siguiente solución: 800 μl de tampón cacodilato sódico 0,2 M pH 7,2, 50 μl de una solución 100 mM de rojo prusiato ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 50 μl de una solución 100 mM de amarillo prusiato ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) y 40 μl de una solución de X-Gal al 2 % en dimetilformamida.
- La solución de tinción se eliminó mediante tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón cacodilato sódico 0,2 M pH 7,2.
- Seguidamente se lavaron dos veces 5 minutos cada vez con agua destilada.
- Las secciones de nódulos se colocaron en portaobjetos y visualizadas bajo el microscopio.

4.10. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA NODULAR MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

4.10.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

4.10.1.1. Inclusión y polimerización de las muestras

- Se realizó un primer período de fijación de los nódulos (12-33-42 días de edad) con glutaraldehído 5% y formaldehído 4% en tampón cacodilato sódico 100 mM pH 7,4, sacarosa 5 μM durante 2 horas a 4 °C.
- Los nódulos se desgasificaron en bomba de vacío mediante varias rondas (2-5 veces) de 1 minuto cada una.
- A continuación, se renovó el fijador para proceder al segundo período de fijación durante 1,5 horas a 4 °C.
- Las muestras se lavaron mediante tres rondas de 1 hora a 4 °C en tampón cacodilato sacarosa.
- Se realizó una postfijación con tetróxido de osmio 1% en tampón cacodilato sacarosa durante 16 horas a 4 °C.
- Previo a la deshidratación de las muestras, se realizaron dos nuevos lavados de 5 minutos a 4 °C en tampón cacodilato sacarosa.
- La deshidratación se llevó a cabo mediante lavados en series de etanol creciente incluyendo en uno de ellos la tinción con uranilo. Concretamente, las tres primeras con etanol 30%, 50% y 70% de 10 minutos de duración a 4 °C.

- Seguidamente se realizó un nuevo lavado con etanol 70% incluyendo uranilo al 1% para la tinción de las muestras durante 24 horas a 4 °C.
- La deshidratación de las muestras se completó mediante lavados con distintos porcentajes de etanol (90%, 10 minutos 4° C; 96%, 30 minutos 4 °C y 100%, 2 lavados de 1 hora 4 °C).
- Las muestras deshidratadas se sometieron a infiltración progresiva en la resina acrílica LR White (London Resin Company, Berkshire, UK) mediante inmersión en una solución con la resina en proporción 1:3 en etanol 100% durante 3 horas a 4° C con agitación suave.
- Se continuó con una infiltración de 16 horas a 4 °C en agitación suave con la resina 1:1 en etanol 100%, seguida de una infiltración de 3 horas a 4 °C en agitación suave con la resina 3:1 en etanol 100% y una infiltración de 2 días a 4 °C sin agitación con la resina pura.
- La resina se renovó y se mantuvo la infiltración durante 24 horas más a 4 °C en agitación suave.
- Para el encapsulado y polimerización se introdujeron las muestras individualmente en cápsulas de gelatina con resina fresca, se mantuvieron verticalmente a 60 °C durante 24 horas y se dejaron enfriar lentamente.

4.10.1.2. Seccionamiento de las muestras

Se tallaron los bloques obtenidos y se seccionaron las muestras encapsuladas mediante ultramicrotomos Reichert Omu2 y Reichert ultracut S (Leica, Vienna, Austria) equipados con cuchillas de diamante Diatome 45°.

4.10.2. MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO

Para la visualización de las secciones (1-2 μm), éstas se tiñeron con azul de toluidina al 1% (p/v) en bórax al 1% durante 4-8 minutos. La estructura de los nódulos se observó en un microscopio óptico Axiophot (Zeiss, Jena, Alemania) con sistema fotográfico integrado. Se utilizaron películas Kodak Gold 100 ASA.

4.10.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Se realizaron cortes ultrafinos de \sim 70-90 nm de las muestras previamente seleccionadas y se recogieron sobre rejillas de cobre de 200 ventanas. Se tiñeron con citrato

de plomo (Reynolds, 1963) durante 1 minuto y se lavaron con agua bidestilada.

Se observaron las muestras con un microscopio electrónico STEM LEO910 (80-100 kV) (Zeiss) dotado con una cámara digital Gatan Bioscan (mod-792) para la adquisición de imágenes.

5. PROGRAMAS Y RECURSOS BIOINFORMÁTICOS UTILIZADOS

- Quantity One[®] (Bio-Rad): Análisis, captura y tratamientos de imágenes de geles electroforéticos.

- Vector NTI Suite 8 (Informax software) : Paquete de herramientas bioinformáticas para tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos

- RNA Analyzer / Bprom : Predicción de hipotéticas secuencias promotoras a partir de secuencias nucleotídicas
<http://rnaanalyzer.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>
<http://www.softberry.com/all.htm>

- Mega 3.1 : Elaboración de árboles filogenéticos evolutivos
<http://www.megasoftware.net/>

- PROSITE: Servidor que contiene bases de datos de dominios, familias y sitios funcionales de proteínas.
<http://expasy.org/prosite/>

- PSORT: Predicción de localización celular de secuencias aminoacídicas.
<http://psort.hgc.jp/form.html>

- SOSUI: Predicción de solubilidad e índice transmembrana de una secuencia aminoacídica.
http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html

CAPÍTULO I: RESULTADOS

**CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN ADYACENTE
AL GEN *fadD* DE *S. meliloti*: ANÁLISIS FUNCIONAL DE SMC02163**

1. ANTECEDENTES

El gen *fadD* (SMc02162) de *S. meliloti* constituye, como se ha mencionado en el apartado 5.5 de Introducción, un ejemplo de determinante genético presente en *Rhizobium* que además de mostrar homología con genes de virulencia de bacterias patógenas, desempeña un papel en el establecimiento de la simbiosis con leguminosas. La proteína FadD de *S. meliloti*, una acil-CoA sintetasa específica de ácidos grasos de cadena larga, influye en la infectividad y competitividad de la bacteria por la nodulación de alfalfa, además de participar en el control de migración multicelular o swarming, e influir en el nivel de expresión de ciertos genes (Soto *et al.*, 2002). Estos hechos llevaron a proponer la hipótesis de que en *S. meliloti*, en respuesta a cambios medioambientales y/o fisiológicos, derivados de ácidos grasos dependientes de la actividad FadD podrían actuar como señal capaz de controlar genes de motilidad y factores de invasión.

Un modelo de actuación similar había sido propuesto para el producto del gen homólogo a *fadD*, conocido como *rpfB*, de la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* (Barber *et al.*, 1997). Hoy se sabe que RpfB junto con RpfF, probablemente una enoil-CoA hidratasa, participa en la síntesis de la molécula señal conocida como DSF (**D**iffusible **S**ignal **F**actor), responsable de regular la síntesis de factores de virulencia, y cuya caracterización bioquímica ha revelado ser un ácido graso insaturado: el ácido *cis*-11-metil-dodecenoico (Tang *et al.*, 1991; Fouhy *et al.*, 2006). El gen *rpfB* de *X. campestris* forma parte de un grupo de 9 genes (*rpfA-I*) localizados en una región de unas 22 Kb del cromosoma de la bacteria, en el que todos, de una u otra manera, participan en la regulación de factores de patogenicidad (**r**egulation of **p**athogenicity **f**actors). Aguas arriba y abajo de *rpfB* (*fadD*) se hallan los genes *rpfA* y *rpfF*, respectivamente. RpfA es una aconitasa que se piensa desempeña un papel en homeostasis del hierro, y RpfF, como se ha comentado, es una enoil-CoA hidratasa que participa en la síntesis de DSF junto con RpfB. Adyacente a *rpfF*, se encuentra el operón *rpfGHC* que codifica un complejo sistema regulador de dos componentes implicado en la percepción y transducción de la señal DSF. Algo más alejados de *rpfB*,

se encuentran *rpfD* que codifica una proteína con dominio de unión a ADN del tipo LytTR, y *rpfE* y *rpfI*, que codifican proteínas conservadas con función desconocida (revisado en Fouhy *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta las similitudes existentes entre *fadD* de *S. meliloti* y su ortólogo *rpfB* en *X. campestris*, sobre todo en lo referente a su influencia en regulación génica así como en la implicación de ambos en el proceso de infección de la planta, se decidió investigar si, al igual que en *Xanthomonas*, el gen *fadD* de *S. meliloti* pudiera estar ligado a otros genes con una posible función en el proceso de interacción con la leguminosa. Para estudiar esta posibilidad, se propuso como objetivo llevar a cabo la caracterización funcional de genes adyacentes a *fadD* en *S. meliloti*.

2. ANÁLISIS *in silico* DE LA REGIÓN *fadD* DE *S. meliloti*

En el momento de iniciar la caracterización funcional de la región *fadD* de *S. meliloti*, no se hallaba disponible la secuencia del genoma de esta bacteria. Para identificar el ADN que flanquea al gen *fadD*, se procedió a la secuenciación de subclones obtenidos a partir del cósmido pRmerpf238 que contenía la región de estudio de la cepa GR4 de *S. meliloti*. La secuencia obtenida se introdujo en la base de datos de EMBL con el código de acceso AJ408880. La secuenciación de 1400 pb “aguas abajo” al gen *fadD*, reveló la existencia de un marco de lectura abierto (ORF) incompleto que se transcribe en el mismo sentido que *fadD*, y cuyo ATG se hallaba a 315 pb del codón de terminación del gen de la acil-CoA ligasa de ác. grasos de cadena larga (Fig. R.I.1). Por otro lado, la secuenciación de unas 500 pb “aguas arriba” al gen *fadD* reveló la existencia de un nuevo ORF que se transcribe en sentido contrario, separado por 338 nucleótidos del codón de inicio de *fadD*.

La posterior publicación de la secuencia del genoma de la cepa 1021 de *S. meliloti* (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/rhime/>) (Galibert *et al.*, 2001), y un análisis con el programa BLASTN reveló la existencia de un 100% de identidad a nivel de nucleótido en las 3574 pb de la región *fadD* de las cepas GR4 y 1021, que comprende el gen *fadD* (SMc02162), y las regiones 5' de los genes SMc02163 o *pgi* y SMc02161 (Fig. R.I.1). Ni *pgi*, ni SMc02161 ni genes adyacentes a éstos, mostraron homología a alguno de los genes *rpf* de *Xanthomonas*. Esto, sin embargo, no descartaba la posibilidad de que los genes adyacentes a *fadD* tuvieran algún papel en el establecimiento de simbiosis con la planta.

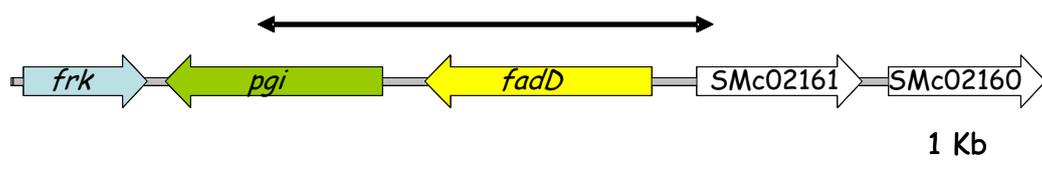


Figura R.I.1. Mapa genético de la región *fadD* de *S. meliloti* 1021. *fadD* (SMc02162) codifica una acil-CoA sintetasa específica de ácidos grasos de cadena larga; *pgi* (SMc02163) fosfoglucoisomerasa; *frk* (SMc02164), fructoquinasa; SMc02161, proteína transmembrana implicada en transporte; SMc02160 permeasa de transporte transmembrana. La doble flecha situada en la parte superior indica la región de ADN secuenciada de la cepa GR4 de *S. meliloti* (código de acceso AJ408880).

SMc02161 aparece anotado como un gen que codifica una proteína de transporte transmembrana. El producto de 411 aminoácidos muestra 11 dominios transmembrana y un dominio AraJ, característico de proteínas implicadas en transporte y metabolismo de carbohidratos. Otras características del análisis *in silico* del producto codificado por SMc02161 son la existencia de un teórico sitio de unión a ATP/GTP (aas 16-23), una región rica en Ala (aas 56-154), así como una homología bastante significativa (hasta el 60% de identidad) con teóricos transportadores de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) de distintas bacterias. Estos datos sugieren que este gen tenga una posible función en el transporte a favor de gradiente de una molécula de bajo peso molecular, probablemente un azúcar. La caracterización de este gen no se ha llevado a cabo en esta Tesis Doctoral.

SMc02163 aparece anotado como gen *pgi* por codificar una proteína de 541 aminoácidos con homología a glucosa-6-fosfato isomerasa o fosfoglucoisomerasa (PGI). *PSORT* identifica dos patrones típicos de proteínas PGI (aas 256-269 y 489-506), mientras *TMPRED* revela un posible dominio transmembrana que abarca los aas 257 a 277. La caracterización funcional de este gen se describe en posteriores apartados.

La comparación de las regiones *fadD* en algunos de los rizobios de los que se dispone la secuencia de su genoma, revela cierto grado de conservación de la disposición génica (Fig. R.I.2). Así, un teórico gen *pgi* se encuentra también localizado aguas abajo del gen *fadD* en *S. medicae*, *R. etli* y *R. leguminosarum* biovar *viciae*. En el caso de *M. loti*, el gen *pgi* se halla separado del gen *fadD* por otros dos ORFs, mientras que en *B. japonicum* no se detecta un gen *pgi* en las proximidades del gen *fadD*. Curiosamente, en esta bacteria, la teórica proteína PGI (BAC52023) se parece poco a la de los otros rizobios. Mientras la homología entre la proteína de *S. meliloti* y las de *S.*

Capítulo I. RESULTADOS

medicae, *R. etli*, *R. leguminosarum* y *M. loti* oscila entre 95,9 y 71,4 % de identidad, la de *B. japonicum* sólo muestra un 26%.

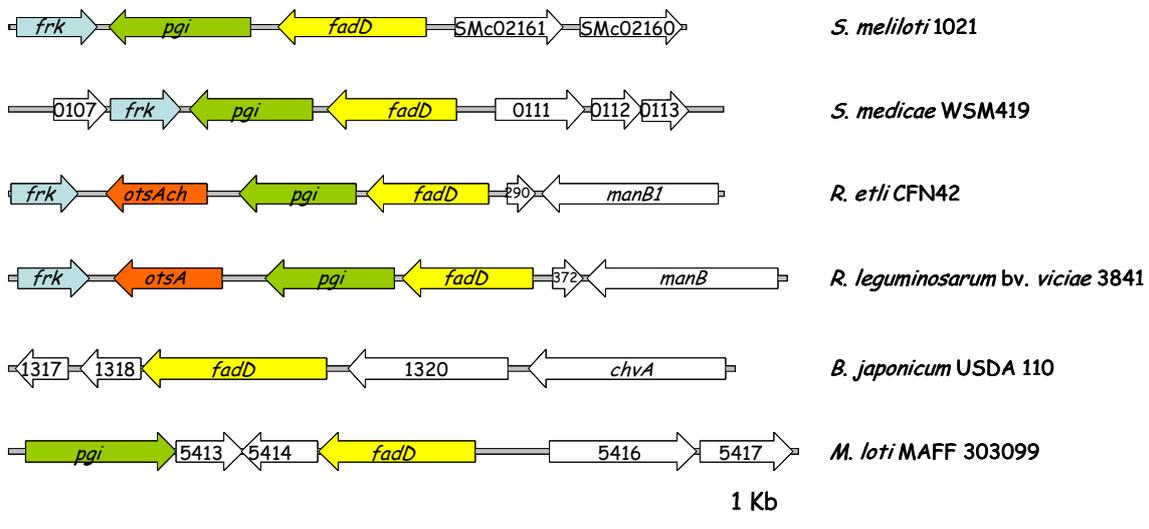


Figura R.I.2. Mapa genético de la región *fadD* de distintas bacterias del orden *Rhizobiales*. *fadD*, acil-CoA sintetasa específica de ácidos grasos de cadena larga; *pgi*, fosfoglucoisomerasa; *frk*, fructoquinasa; *otsA*, trehalosa-6-fosfato sintasa; *manB*, beta-manosidasa; *chvA*, proteína de unión a ATP de transporte de beta 1,2 glucano. En blanco, genes que codifican proteínas de función desconocida.

Además de los dos ORFs que flanquean al gen *fadD*, el análisis de los 315 nucleótidos de la región intergénica *fadD-pgi* en *S. meliloti*, reveló rasgos interesantes. Una búsqueda con el programa *BLASTN* de secuencias nucleotídicas conservadas, puso de manifiesto que una región de 148 nucleótidos situada aguas abajo de *fadD* (bloque de color morado en Fig. R.I.3) es un elemento de ADN repetitivo que se encuentra presente con más o menos grado de conservación en otras zonas del genoma de *S. meliloti* 1021 (Fig. R.I.4). Esta secuencia es especialmente abundante en el cromosoma de la bacteria aunque también se han detectado algunas copias en el plásmido simbiótico pSymB. Además de en el genoma de *S. meliloti* 1021, esta región también parece estar presente en otras cepas de *S. meliloti*, así como en otros rizobios tales como *S. medicae* (plásmido pSMED01), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (cromosoma), y con algo menos de conservación en *S. fredii*, *R. tropici* y *B. japonicum*. Fuera de los rizobios sólo se ha detectado la presencia de esta secuencia de ADN en otra bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, y curiosamente en el eucariota pez cebra. El hecho de que esta región sea una secuencia corta (menos de 200 pb) de ADN repetitivo, intercistronica, no codificante que se encuentra fundamentalmente en miembros del orden *Rhizobiales*, nos lleva a

considerarla como RIME o **R**hizobium-specific **I**ntergenic **M**osaic **E**lement (Osteras *et al.*, 1995). Proponemos el nombre de RIME3 para este elemento, ya que su secuencia es distinta de la de los elementos ya descritos RIME1 y RIME2 (Osteras *et al.*, 1995).

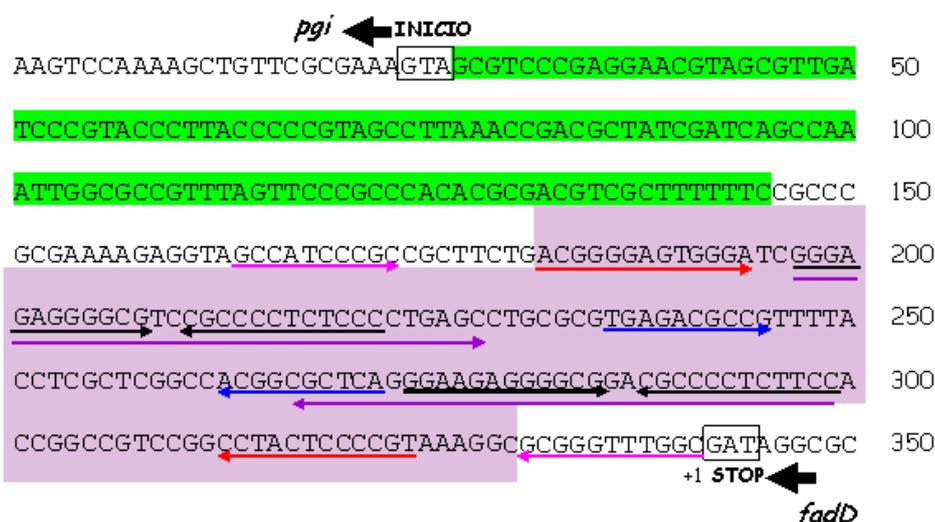


Figura R.I.3. Región intergénica *fadD-pgi* de *S. meliloti*. Con cuadros se muestran los codones de stop y de inicio de los genes *fadD* y *pgi*, respectivamente. En bloque morado se muestra la secuencia repetitiva RIME3 con los dos palíndromos de 26 nt (flechas negras). Los palíndromos a su vez constituyen secuencias repetidas e invertidas (flechas moradas) capaces de dar lugar a una estructura tallo-lazo. Con flechas de color rojo, rosa y azul se muestran 3 de otras de las secuencias repetidas e invertidas presentes en esta región de ADN. En verde se señala la secuencia conservada en la región intergénica *fadD-pgi* de *S. meliloti* y *S. medicae*.

El uso del programa *MFOLD* ha puesto de manifiesto la existencia de una estructura secundaria bastante compleja en el elemento RIME3 presente en la región intergénica *fadD-pgi* con numerosas secuencias repetidas invertidas que forman palíndromos o estructuras en tallo y lazo (Fig. R.I.3 y R.I.4). Destacan dos palíndromos de 26 nucleótidos (flechas negras en la Fig R.I.3) separados por 51 nt, secuencia que a su vez tiene el potencial de formar una estructura en tallo y lazo, ya que los palíndromos forman parte de secuencias repetidas invertidas imperfectas (flechas moradas en la Fig. R.I.3), lo que podría sugerir que se han originado por duplicación. Hay que indicar que los dos palíndromos de RIME3 son prácticamente idénticos a dos (B y C) de los 3 palíndromos presentes en dos estructuras en mosaico identificadas en el operón *bet* de *S. meliloti* (Osteras *et al.*, 1998), pero existe gran divergencia en el resto de la secuencia. Los palíndromos de RIME3 están muy conservados en las distintas copias estudiadas, no así el número de nucleótidos que los separan ni su orientación con respecto a los genes adyacentes (Fig. R.I.4), hechos que ya han sido observados para el caso de otras RIMEs (Osteras *et al.*, 1995).

dependiente de formato; *agpA*, transportador ABC periplásmico de alfa-galactósido; *agaL1*, alfa-galactosidasa.

En cuanto al resto de la región intergénica, cabe mencionar que la secuencia correspondiente a los 169 nucleótidos localizados aguas arriba al gen *pgi* (señalada en verde en la Fig. R.I.3) es prácticamente idéntica a la secuencia localizada aguas arriba del gen *pgi* de *S. medicae* (Fig.R.I.5). Comparado con *S. meliloti*, en *S. medicae* la región intergénica *fadD-pgi* es más pequeña, hallándose ausente el elemento RIME3.

		1		50
<i>S. meliloti</i>	(1)	AGTA	GCGTCCCAGGAACGTAGCGTTGATCCCGTACCCTTA	CCCGTAG
<i>S. medicae</i>	(1)	AGTA	GCGTCCCAGGAACGTAGCGTTGATCCCGTTATCTTA	AGCCCGTAG
Consenso	(1)	AGTAGCGTCCCAGGAACGTAGCGTTGA	CCCGT	CTTA CCCGTAG
		51		100
<i>S. meliloti</i>	(51)	CCTT	AACCGACGCTATCGATCAGCCAAATGGCGCCGTTT	AGTTCCCGC
<i>S. medicae</i>	(51)	CCTT	AACCGACGCTATCGATCAGCCAAATGGCGCCGTTT	AGTTCCCGC
Consenso	(51)	CCTT	AACCGACGCTATCGATCAGCCAAATGGCGCCGTTT	AGTTCCCGC
		101		150
<i>S. meliloti</i>	(101)	CCAC	ACGCGACGTCGCTTTTTTCG	CCGCGAAGAG-GTAGCCATCC
<i>S. medicae</i>	(101)	CCAC	GACGCGACGTCGCTTTTTTCGCCTACCGAGGAGGAGTAG	GCCGGC
Consenso	(101)	CCAC	ACGCGACGTCGCTTTTTTC	C CGA AG G GTAG C C
		151		200
<i>S. meliloti</i>	(149)	CGCC	CTTCTGACGGGAGTGGGATCGGGAGAGGGGCGTC	CGCCCTCTC
<i>S. medicae</i>	(151)	GGCG	TATGA-AAGTTCCACCTCTCTCTCA	CCCCCGAACGCGCGGATC
Consenso	(151)	GC G T A G G	TC G A	CG CGCC C TC
		201		250
<i>S. meliloti</i>	(199)	CCCTGAGCCTGCGCGTGAGACGCCGTTTTACCTCGCTCGGCCACGGCGCT		
<i>S. medicae</i>	(200)	G-----		
Consenso	(201)			
		251		300
<i>S. meliloti</i>	(249)	CAGGGAAGAGGGGCGGACGCCCTCTTCCACCGCCGTC	CGGCTACTCC	
<i>S. medicae</i>	(201)	-----		
Consenso	(251)			
		301		326
<i>S. meliloti</i>	(299)	CCGTAAAGGCGGGTTTGGCG	GATAG	
<i>S. medicae</i>	(201)	-----		
Consenso	(301)			

Figura R.I.5. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región intergénica de los genes *fadD* y *pgi* en las bacterias *S. meliloti* y *S. medicae*. En amarillo sobre letra roja se señalan regiones conservadas en la secuencia. Encuadrados en rojo se muestran los codones de parada del gen *fadD* para ambas bacterias. En cuadro verde se detallan los codones de inicio del gen *pgi* para ambas bacterias.

3. ANÁLISIS *in silico* Y FILOGENÉTICO DE SMc02163

Como se ha comentado en el apartado anterior, SMc02163 aparece anotado en el genoma de *S. meliloti* como gen *pgi* por codificar una proteína de 541 aminoácidos con homología a glucosa-6-fosfato isomerasas o fosfoglucoisomerasas (PGIs). La actividad PGI (EC 5.3.1.9.), descrita en multitud de organismos (eucariotas, procariontes y arqueas), cataliza la isomerización reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. Esta actividad es clave en el metabolismo de carbohidratos de la célula, interviniendo en procesos de glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas; Entner-Doudoroff), gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato, y en la glicosilación de proteínas, lípidos y otras moléculas.

La gran mayoría de proteínas PGI pertenecen a la superfamilia PGI que a su vez se divide en dos grandes familias, la familia PGI y la familia de proteínas bifuncionales fosfoglucoasa/fosfomanosa isomerasas (PGI/PMI) (Figura R.I.6). Proteínas de la superfamilia PGI, también conocidas como PGI convencionales, se han encontrado en todos los dominios de la vida (eucariotas, procariotas y arqueas), aunque PGI/PMIs bifuncionales sólo se han detectado en ciertos tipos de arqueas. Existe otro grupo de proteínas PGI (PGI tipo cupin o cPGI) caracterizadas por estar constituidas por subunidades más pequeñas en las que se identifica un dominio central β laminar formando un pequeño barril β denominado “cupin”. Estas cPGIs se han encontrado en algunas eubacterias y arqueas (Hansen *et al.*, 2005).

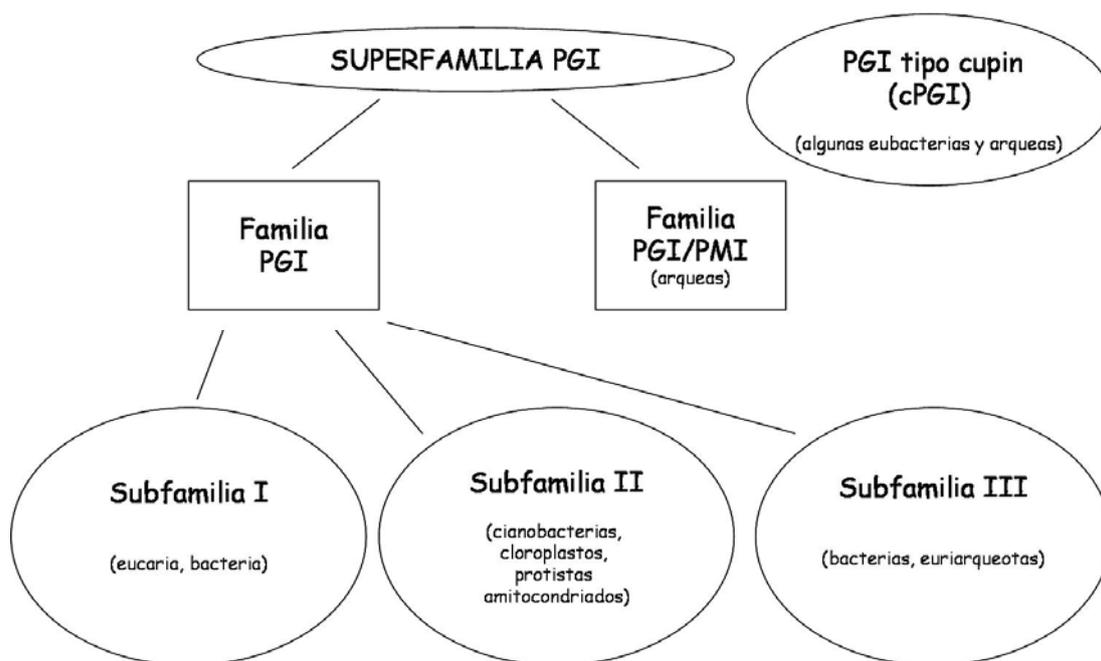


Figura R.I.6. Clasificación de las proteínas con actividad PGI.

El análisis con el programa *BLASTP* ha revelado que la hipotética proteína codificada por el gen SMC02163 muestra las mejores identidades con teóricas PGIs de diversas α -proteobacterias entre las que se encuentran miembros del orden Rhizobiales. En este caso, las identidades oscilan entre el 95% que muestra la teórica PGI de *S. medicae* hasta un 71% para la de *M. loti* MAFF303099. En la Fig. R.I.7 se muestra un alineamiento de la secuencia aminoacídica de proteínas PGI homólogas a SMC02163.

SMc02163	(1)	-----MKALVENLKAT--ARETDATDIRAAFAADPNRFRFSTAFDD---LLFDYSKCAVNDRIIDGLEALAK
<i>M. loti</i> MAFF303099	(1)	---MDKSAFQKQLAALRDHRSAAAPASMRQAFADPQRQAFATDGD---LLLDWSKCAVDATMDLLEKLA
<i>E. coli</i>	(1)	MKNINPTQTAAWQALQKHFDEMK-DVTIADLFAKDGDRFSKFSATFDD---QMLVDYSKNRITETETLAKLQDLAK
<i>Homo sapiens</i>	(1)	--MAALTRDPQFQKLQWYREHRSELNRLRFLDANKDRFNHFSLTNTNHGHILLVDYSKNLVTEDVMRMLVDLAK
Consenso	(1)	TKA QFQLLQ F R KADLSIR LFAADPDRFSKFSATFDD LLDVYSKNAVTEDTMDLLEDLAK
SMc02163	(64)	AAKVEKRDAMFRGDIINITEERAVLHTALNRNSRNPVLVDGKDVMPDVNAVLEAMGKFADDIRSGALKGATGKK
<i>M. loti</i> MAFF303099	(68)	AADLEGRRAAMFAGKKINITEEDRAVLHTALNRNLSTGVTVDGQDVKADVLSVLDAMGAFADAIRSGKALGATGKK
<i>E. coli</i>	(72)	ECDLAGAIKSMFSGEKINRTEENRAVLHVLRNRSNTPILVDGKDVMPDVNAVLEKMTFSEAIISGKWKYTGKA
<i>Homo sapiens</i>	(74)	SRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVLRNRSNTPILVDGKDVMPDVNKLDMKSFQQRVRSQDWKGYTGKT
Consenso	(76)	AADLEGARDAMFAGEKINITEEDRAVLHVLRNRSNTPILVDGKDVMPDVNAVLDKMKSFADAIRSQDWKGYTGKK
SMc02163	(139)	ITDVVNIGIGGSDLGPVMTLALAPFHD-GPRLHFVSNVDGAHIADTLTLLDPETSLFIVASITPTTIEITMNA
<i>M. loti</i> MAFF303099	(143)	ITDIVNIGIGGSDLGPAMATLALAPYHD-GPRAHYVSNIDGAHIHDTLKLGLSAETTLFIVASITPTTIVETMNAQ
<i>E. coli</i>	(147)	ITDVVNIGIGGSDLGPVMTLALAPYK-N-HLNMHFVSNVDGTHIAEVLKKNPPTTLFLVAVITPTTQETMNAH
<i>Homo sapiens</i>	(149)	ITDVINIGIGGSDLGPLMVTALPYSSGGPRVWVSNIDGTHIAKTLAQLNPESSELIASITPTTQETITNAE
Consenso	(151)	ITDVVNIGIGGSDLGPLMVTALAPYHD GPRLHFVSNIDGTHIADTLK LNPETSLFIVASITPTTQETMNA
SMc02163	(213)	TARAFIAGKLG-EAAVGHFAAVSTALDKVGFIDAAARVFGFDWVGGYSLWSAIGLPLMIAIGKENFGRFLD
<i>M. loti</i> MAFF303099	(217)	TARDWVQKALG-KQAVGHFAAVSTALDLVAKFGIEADRVFGFDWVGGYSLWSAIGLPLMIAIGKENFGRFLD
<i>E. coli</i>	(221)	SARDWFLKAAGDEKHVAKHFAALSTNAKAVGFGIDTANMFEFDWVGGYSLWSAIGLPLMIAIGKENFGRFLD
<i>Homo sapiens</i>	(224)	TAKEWFLQAAKDPQSAVAKHFVALSTNTTKVKEFGIDPQNMFEFDWVGGYSLWSAIGLPLMIAIGKENFGRFLD
Consenso	(226)	TARDWFLKALGDEAAVAKHFAALSTNLDKVGFEFGIDAAARMFGFDWVGGYSLWSAIGLPLMIAIGKENFGRFLD
SMc02163	(287)	GGHAIDHFRSAPLRQNIPLMLLGLIGFYNRNVLGYPSRAILPYDQRLTRFPAYLQGLDM-SNGKGVTLDDGTPVEF
<i>M. loti</i> MAFF303099	(291)	GAHEMDQHFRTAPLAGNLPALLGLVWVHRVICGYPARAVIPYDQRLSRPLPAYLQGLDM-SNGKGVTLDDGTPVAT
<i>E. coli</i>	(296)	GAHAMDKHFSTTPAEKNLPVLLALIGIWIYNNFPGAETAILPYDQYMHFAAYFOGDM-SNGKYVDRNGVVDY
<i>Homo sapiens</i>	(299)	GAHWMDQHFRTTPLEKNLPVLLALIGIWIYINFCGCETHAMLPYDQYLHRFAAYFOGDM-SNGKYITKSGTRVDH
Consenso	(301)	GAHAMQHFRTTPLEKNLPVLLALIGIWIYRNFYGPTRAILPYDQYLHRFPAYLQGLDM-SNGKYVTLDDGTPVDH
SMc02163	(362)	STGPIVWGEPTNGQAFYQLIHQGTDVIPAEFMIAANGHEKDLR-HQHQLLMANCLAQSEALMKGRTLAEAKAQ
<i>M. loti</i> MAFF303099	(366)	PTGPIVWGEPTNGQAFYQLIHQGTDFIPVEFLAAVGHPELKH-HQHDLLANCLAQSEALMKGRTLDEARAQ
<i>E. coli</i>	(371)	QTGPIVWGEPTNGQAFYQLIHQGTQKMPVPCDFIAPATHNPLSD--HHQKLLSNFFAQTEALAFGKSRVEVQE
<i>Homo sapiens</i>	(374)	QTGPIVWGEPTNGQAFYQLIHQGTQKMPVPCDFLIPVQTHPIRKLGHKILLANFLAQTEALMRGKSTEARKE
Consenso	(376)	QTGPIVWGEPTNGQAFYQLIHQGTQKMPVPCDFLIPVQTHPIRKLGHKILLANFLAQTEALMRGKSTEARKE
SMc02163	(436)	LTSKGMDDAKADKIAPHRVFTGNRPSLTIIVYDQLDPFALGRLIALYEHVRFVVEGALFNINSPDWGVELGRELAT
<i>M. loti</i> MAFF303099	(440)	MLAKGMKPADVDKIAPHRVFSGNRPSLTIIVYDQLDPFALGRLIALYEHVRFVVEGALFNINSPDWGVELGRELAT
<i>E. coli</i>	(444)	YRDQKDPATLDYVVPKVFEGNRPTNSILLREITPFLGALIALYEHKIFVQGIININSPDWGVELGRELAT
<i>Homo sapiens</i>	(449)	LQAAGKSPEDLERLLPHKVFEGNRPTNSIVFTKLTFFMLGALVAMYEHKIFVQGIININSPDWGVELGRELAT
Consenso	(451)	L AKGMDPADLDKIAPHKVFEGNRPSNLSILYRKLTPFSLGRLIALYEHKIFVQGIININSPDWGVELGRELAT
SMc02163	(511)	GLLPVIEGKESAEGHDSSTAGLVAALLKAAR----
<i>M. loti</i> MAFF303099	(515)	GLLPVIEGKESAAANDASTRGLVERIHQLRGSE--
<i>E. coli</i>	(519)	RILPELKDDEISSHDSSTNGLINRYKAWRG----
<i>Homo sapiens</i>	(524)	KIEPELDGSAQVTSHDASTNGLINFIKQREARVQ
Consenso	(526)	GILPVIEGKESASSHDASTNGLINRIKQ RGA

Figura R.I.7. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de SMc02163 con una proteína homóloga en *M. loti* y con proteínas PGI funcionalmente caracterizadas de *E. coli* y de humanos. Encuadrados se detallan los motivos consenso de la superfamilia PGI: motivo 1 (naranja): [DENSE]-X-[LIVMT]-[GP]-G-R-[FYT]-[STA]-[LIVMFSTAPE]-X-[GSTA]-[PSTACMV]-[LIVMSAC]-[GSAN], y motivo 2 (azul): [GSA]-X-[LIVMYCA]-[LIVMFYWN]-X₄-[FY]-[DNHT]-Q-X-[GA]-[IV]-[EQS]-X₂-K. En rojo se muestran los aminoácidos totalmente conservados; en azul los fuertemente conservados; en verde aminoácidos poco similares; y en negro los no conservados. Encuadrados en rosa, aminoácidos propuestos para la unión del sustrato (Davies *et al.*, 2003), y en verde, aminoácidos conservados propuestos para el centro activo de la proteína (Read *et al.*, 2001). Encuadrado en verde y con línea rosa, aminoácido propuesto para el centro activo de la proteína y que interviene en unión al sustrato.

Entre los homólogos al producto de SMc02163 también aparecen teóricas PGIs de eucariotas siendo la más parecida la de *Bombix mori* (gusano de seda) (56% identidad). Las identidades mostradas con algunas de las PGIs que han sido funcionalmente caracterizadas son de 51.6% con la proteína de *E. coli* (ver alineamiento en Fig. R.I.7) pero sólo 18.3% con la de *Bacillus stearothermophilus* como ejemplos de PGIs bacterianas, y 51.3 o 50.7% con PGI de conejo y humana, respectivamente, como ejemplos de PGIs eucariotas (Fig. R.I.7). El programa *PROSITE* identifica en el producto codificado por SMc02163 dos motivos típicos de PGIs convencionales: el motivo 1 [DENSE]-x-[LIVM]-[GP]-G-R-[FY]-[ST]-[LIVMFSTAP]-x-[GSTA]-[PSTACM]-[LIVMSA]-[GSAN] en los aas 256-269 de la proteína, y el motivo 2 [GSA]-x-[LIVMCAYQS]-[LIVMFYWN]-x(4)-[FY]-[DNTH]-Q-x-[GA]-[IV]-[EQST]-x(2)-K en los aas 489-506 (Fig. R.I.7). Por el contrario, el motivo S-Y-S-G-[NT]-T-[ESTIL]-E-T-[LIV] característico de la familia PGI/PMI se halla ausente (Hansen *et al.*, 2004). También aparecen conservados en la proteína de *S. meliloti*, aminoácidos que en proteínas PGI de eucariotas han sido identificados como los que participan en la unión al sustrato (Davies *et al.*, 2003), así como los que forman parte del centro activo del enzima (Read *et al.*, 2001). Todos estos datos sugieren que SMc02163 codifica una proteína perteneciente a la familia PGI muy parecida a la proteína de eucariotas.

Curiosamente, además de SMc02163, *S. meliloti* dispone de otras dos PGIs tipo arquea o cPGI: EmcPGIA de 214 aas y EmcPGIB de 200 aas codificadas por los genes SMc02042 y SMb20857, respectivamente (Hansen *et al.*, 2005). La homología entre la PGI codificada por SMc02163 y las cPGI de *S. meliloti* es prácticamente inexistente (5.7% y 4.1% de identidad). Hemos realizado un análisis filogenético utilizando el algoritmo neighbor-joining (NJ) de *MEGA 2.1* en el que hemos incluido las tres PGIs de *S. meliloti* y miembros representativos de las distintas familias y subfamilias PGI. Como se aprecia en la Fig. R.I.8, la proteína codificada por SMc02163 se engloba dentro de la rama correspondiente a la Subfamilia I de la familia PGI correspondiente a secuencias eucariotas y de algunas bacterias. Estas últimas podrían haber adquirido el gen por transferencia lateral desde un eucariota como ya ha sido sugerido (Katz, 1996). Por el contrario, los productos codificados por SMc02042 y SMb20857, se localizan en la rama de las PGI tipo cupin.

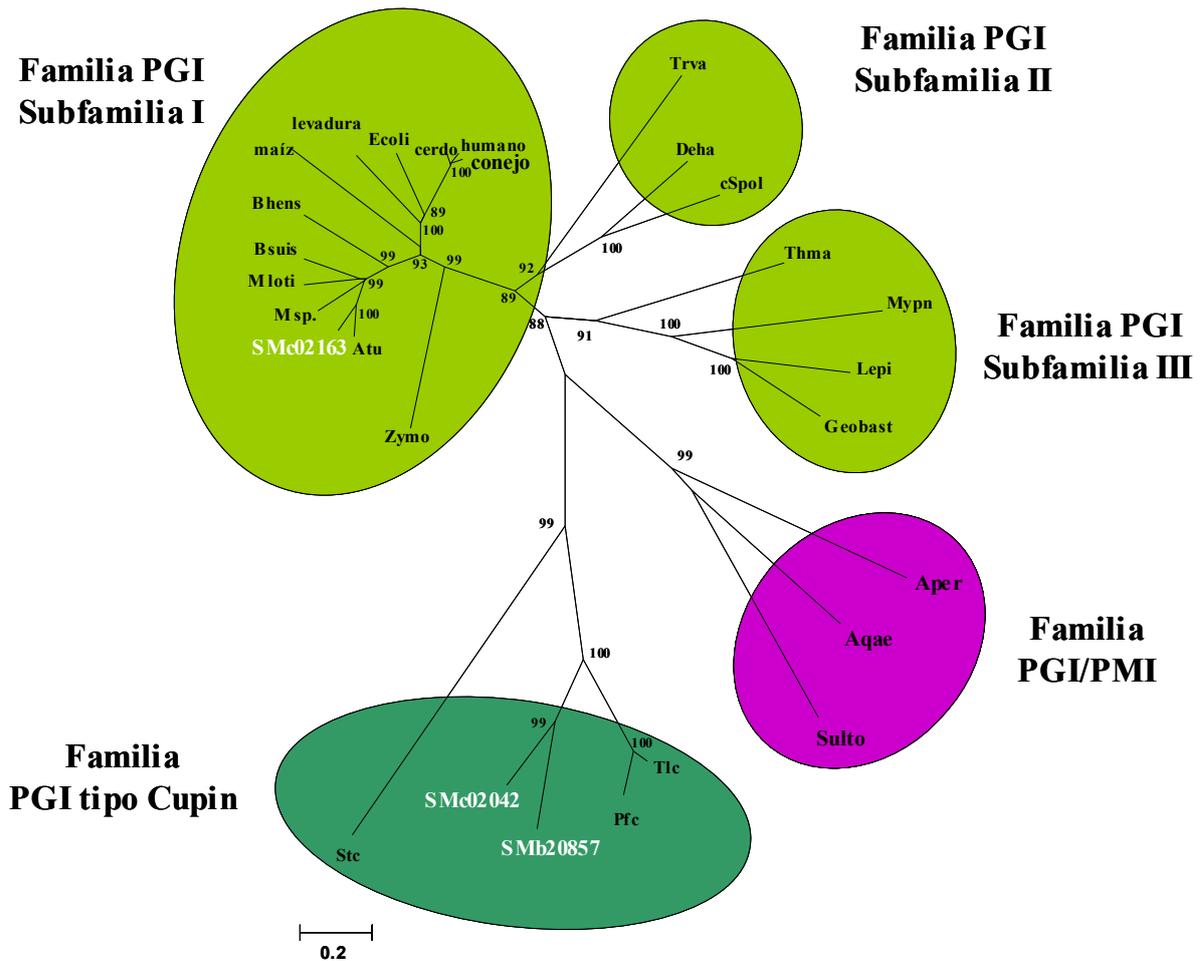


Figura R.I.8. Relación filogenética de proteínas con actividad PGI, entre las que se incluyen SMc02163 y otras dos proteínas codificadas en el genoma de *S. meliloti* 1021. En la construcción del árbol filogenético se usó el método Neighbor-Joining del programa MEGA 2.1, con corrección de Poisson y un número de 2000 repeticiones (Bootstrap). Los números en los nodos son valores de bootstrapping de acuerdo al algoritmo neighbor-joining. Códigos de acceso en NCBI: Atu, *A. tumefaciens* NP_353434; Mloti, *M. loti* NP_106081; Msp, *Mesorhizobium sp.* BCN1 YP_672640; Bsuis, *Brucella suis* NP_697319; Bhens, *Bartonella henselae* YP_032994; maíz, *Zea mays* AAA82734; levadura, *Saccharomyces cerevisiae* NP_009755; Ecoli, *E. coli* P0A6T1; cerdo, *Sus scrofa* NP_999495; humano, *Homo sapiens* NP_000166; conejo, *Oryctolagus cuniculus* AAF35988; Zymo, *Zymomonas mobilis* YP_162947; Trva, *Trichomonas vaginalis* XP_001323512; Deha, *Desulfotobacterium hafniense* YP_518267; c-Spol, *Spinacia oleracea chloroplast* CAA03982; Thma, *Thermotoga maritima* NP_229186; Mypn, *Mycoplasma pneumoniae* NP_109938; Lepi, *Leptospira interrogans* Q8EZG6; Geobast, *Geobacillus stearothermophilus* P13376; Aper, *Aeropyrum pernix* BAA79746; Aqae, *Aquifex aeolicus* NP_213515; Tlc, *Thermococcus litoralis* P84140; Pfc, *Pyrococcus furiosus* NP_577925; Sulto, *Sulfolobus tokodaii* NP_378246; Stc, *Salmonella typhimurium* NP_461684.1.

4. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN SMC02163 DE *S. meliloti*

4.1. Complementación del fenotipo de un mutante *pgi* de *E. coli*

El gen *pgi* desempeña un papel clave en el metabolismo carbonado de multitud de organismos, catalizando la isomerización reversible de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. De este modo, mutaciones en este gen ocasionan defectos en la utilización de distintas fuentes carbonadas en función de las características metabólicas de cada organismo. En *E. coli* se ha descrito que en condiciones aeróbicas un mutante *pgi* crece bien con fructosa como única fuente de carbono, pero crece lentamente cuando usa la glucosa como única fuente carbonada, la cual tiene que ser catabolizada a través de la ruta de las pentosas fosfato en lugar de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Canonaco *et al.*, 2001) (Figura R.I.9).

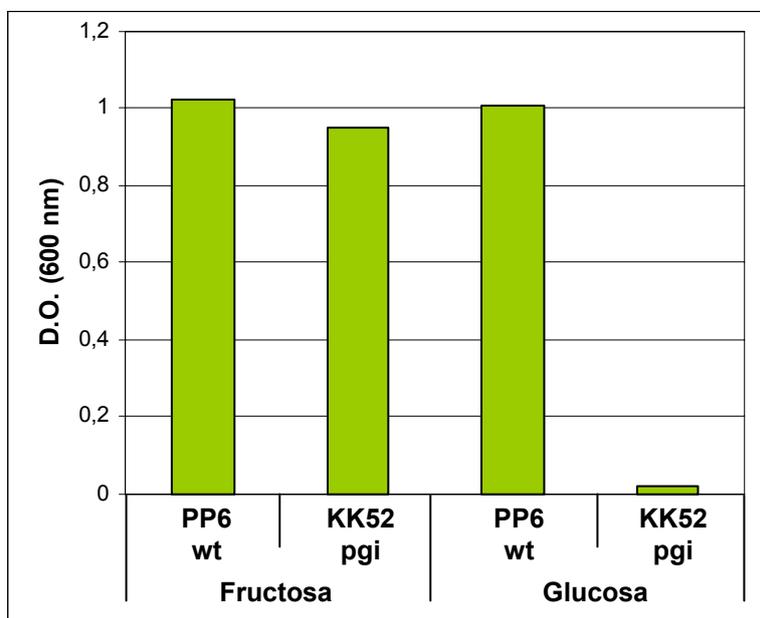


Figura R.I.9. Crecimiento de cepas silvestre y mutante *pgi* de *E. coli* en medio mínimo M9 con fructosa o glucosa como única fuente de carbono. Los datos corresponden a la medida de la densidad óptica tras 19 horas de cultivo.

Como se ha comentado en el apartado anterior, la teórica proteína codificada por SMC02163 muestra un 51,6 % de identidad con la proteína PGI de *E. coli*. Para comprobar si el gen de *S. meliloti* codifica una proteína con actividad PGI, decidimos ensayar la capacidad de crecimiento en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, de un mutante *pgi* de *E. coli* que contuviera el gen SMC02163. Para ello, se obtuvo la construcción pPGI500 en la que la secuencia codificante de SMC02163 se colocó bajo el control del promotor del triptófano (Trp) de *Salmonella* (ver Anexo I.1).

Este promotor conlleva altos niveles de expresión de los genes que están bajo su influencia tanto en *E. coli* como en *S. meliloti* (Egelhoff & Long, 1985). Como control del ensayo de complementación usamos la construcción pPGI400, idéntica a pPGI500 salvo por el hecho de que la secuencia codificante de SMc02163 se encuentra en orientación contraria con respecto al promotor Trp (Anexo I.1). Ambas construcciones se introdujeron mediante transformación de manera independiente tanto en la cepa silvestre de *E. coli* (PP6) como en la cepa mutante *pgi* (KK52). Los correspondientes transformantes se cultivaron en medio mínimo M9 líquido con glucosa al 0,5 % como única fuente de carbono y se determinó su capacidad de crecimiento mediante la medida de la densidad óptica (D.O.) a 600 nm. Como se puede apreciar en la Figura R.I.10, mientras la construcción pPGI400 no tuvo efecto alguno sobre la capacidad de crecimiento del mutante *pgi* de *E. coli*, la presencia del plásmido pPGI500 consiguió recuperar la tasa de crecimiento de KK52, alcanzándose niveles similares a los mostrados por la cepa silvestre PP6.

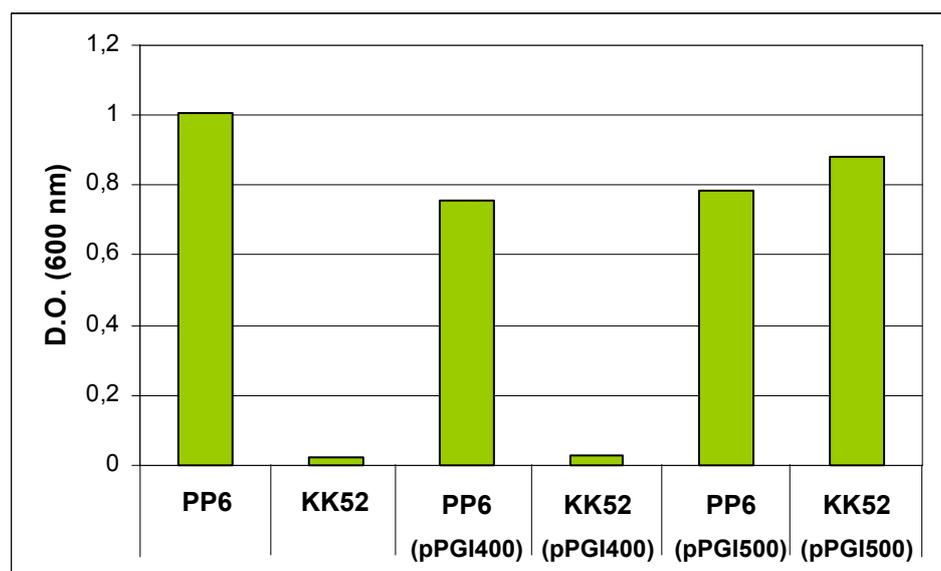


Figura R.I.10. Crecimiento en medio mínimo M9 con glucosa como única fuente de carbono de las cepas silvestre (PP6) y mutante *pgi* (KK52) de *E. coli* en ausencia y presencia de las construcciones pPGI400 y pPGI500. Los datos corresponden a la medida de la densidad óptica tras 19 horas de cultivo.

Asimismo, se analizó la actividad PGI presente en extractos celulares crudos de las distintas cepas de *E. coli* crecidas en medio LB. Como se observa en la figura R.I.11, la producción de NADPH (medida indirecta de la actividad PGI) en extractos del mutante *pgi* de *E. coli* era 7 veces inferior a la mostrada por extractos de la cepa

silvestre. Aunque la presencia de la construcción pPGI400 consiguió incrementar algo (unas 2 veces) la actividad PGI presente en extractos del mutante, ésta seguía siendo significativamente inferior a la mostrada por la cepa PP6. Por el contrario, la presencia de la construcción pPGI500 no sólo consiguió recuperar la actividad PGI, sino que ésta fue incluso ligeramente superior (1,7 veces) a la mostrada por la cepa silvestre, probablemente resultado de la expresión fuerte y constitutiva de SMc02163 dirigida por el promotor Trp así como por el efecto extracopia conferido por el plásmido. El conjunto de estos resultados demuestran que el gen SMc02163 de *S. meliloti* codifica una proteína que presenta actividad PGI.

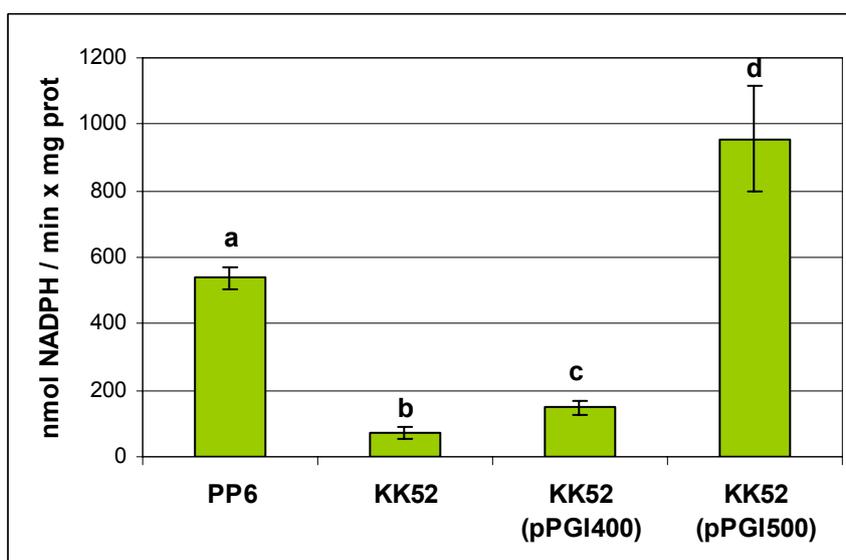


Figura R.I.11. Actividad PGI presente en extractos crudos de las cepa silvestre (PP6) y mutante *pgi* (KK52) de *E. coli* en presencia y ausencia de las construcciones pPGI400 y pPGI500. Los valores representan la media y el error estándar de seis determinaciones de tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

4.2. Obtención de un mutante SMc02163 de *S. meliloti*

Hasta donde llega nuestro conocimiento, hay dos casos descritos en la literatura de mutantes de *Rhizobium* defectivos en actividad PGI, pero en ninguno de ellos se llevó a cabo una caracterización genética que relacione el defecto metabólico a un locus en concreto (Arias *et al.*, 1979; Raleigh & Signer, 1982). Arias y colaboradores (1979), tras llevar a cabo una mutagénesis con nitrosoguanidina, aislaron un mutante de la cepa L5-30 de *R. meliloti* (hoy *S. meliloti*) incapaz de crecer con manitol como única fuente de carbono. El mutante que resultó ser defectivo en actividad PGI, tampoco era capaz de crecer en sorbitol, fructosa, manosa, ribosa, arabitol o xilosa. En cambio, sí era capaz de

utilizar glucosa o glicerol entre otras fuentes carbonadas. Interesantemente, el mutante producía unas 5 veces menos exopolisacárido (EPS) que la cepa silvestre y mostraba defectos en fijación de nitrógeno. Posteriormente, Raleigh & Signer (1982) aislaron mutantes de *R. phaseoli* resistentes a bacteriófagos, entre los que se hallaba un mutante *pgi* incapaz de producir EPS y con fenotipo Nod⁻ en plantas de judía.

Para determinar la funcionalidad de SMC02163 en *S. meliloti*, se decidió llevar a cabo la mutagénesis dirigida del gen en las cepas GR4 y 1021 mediante reemplazo del alelo silvestre por un alelo mutado, en el que un fragmento interno *EcoRV* de aproximadamente 300 pb fue sustituido por un casete de resistencia a estreptomicina y espectinomicina (Sm^R/ Spc^R) (Anexo I.2.). En un primer intento, el intercambio alélico se llevó a cabo utilizando pK18*mobsacB* como vector suicida. Sorprendentemente, en el último paso de selección muchas de las colonias Sm^RSpc^RSac^R aparecidas (más del 90%) resultaron ser también Km^R, indicando que el vector no se había escindido. Los escasos posibles mutantes (colonias Sm^R Spc^R Sac^R Km^S) se analizaron mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI*, usando como sonda un fragmento *EcoRI* de 1,1 Kb del plásmido pPGI4. Esta sonda detecta en la cepa silvestre un fragmento *EcoRI* de 1,46 Kb. La mutagénesis diseñada modifica el tamaño de este fragmento *EcoRI* a uno de 3,14 Kb. Curiosamente, todas las colonias analizadas derivadas tanto de GR4 como de 1021 mostraron la presencia de dos señales de hibridación: una correspondiente al alelo mutado (3,14 Kb) pero también una señal correspondiente a la presencia del alelo silvestre (1,46 Kb) (Fig. R.I.12). Este resultado sugería que en estas colonias había tenido lugar una fuerte presión selectiva favoreciendo la aparición de mutaciones en el gen *sacB*, en lugar de ocurrir un fenómeno de recombinación homóloga que provocase el intercambio alélico necesario para generar el mutante *pgi*.

La selección de la mutagénesis se llevó a cabo en un primer momento en MM con manitol y glutamato como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Una posibilidad que podría explicar la imposibilidad de obtener el mutante era que éste fuese incapaz de crecer utilizando manitol como única fuente de carbono, tal y como le ocurría al mutante descrito por Arias *et al.*, (1979). Para resolver esta cuestión, se volvió a repetir la mutagénesis pero esta vez llevando a cabo la selección en distintos medios: medio mínimo con glucosa 1% y glutamato, medio mínimo con glicerol 0,5 % y KNO₃ 6 mM, y en medio TY. En todos los casos, la frecuencia de colonias que siendo resistentes a sacarosa también eran Km^R era muy alto (más del 97%). Las escasas

colonias que aparecían sensibles a la kanamicina tras ser analizadas mostraron nuevamente la presencia tanto del alelo silvestre como del alelo mutado.

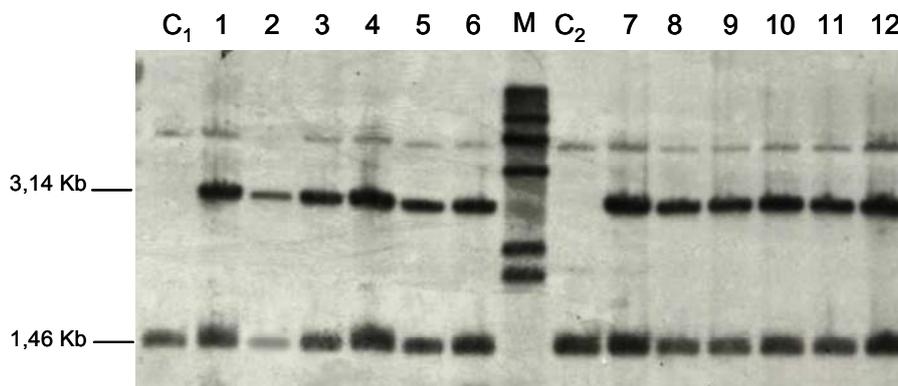


Figura R.I.12. Comprobación mediante hibridación de ADN total digerido con *EcoRI* de posibles mutantes para el gen SMc02163 de GR4 y 1021 de *S. meliloti* obtenidos con el vector suicida pSTEP4. Como sonda se usó un fragmento *EcoRI* procedente del plásmido pPGI4. Carriles: C₁. GR4; 1-6. Falsos mutantes derivados de GR4; C₂. 1021; 7-12. Falsos mutantes SMc02163 derivados de 1021. M. Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina.

Pensando en una posible interferencia de la sacarosa utilizada en la selección positiva del mutante, se intentó la estrategia del intercambio alélico con otro vector suicida (pSUP202*pol4*) (Anexo I.2), así como llevar a cabo la inactivación del gen mediante cointegración del plásmido pKES5, incluyendo secuencia del vector, fenómeno que sólo requiere un evento de entrecruzamiento. En ambos casos la selección se hizo tanto en TY como en medio mínimo con glicerol y KNO₃. Mientras con la primera estrategia las colonias Sm^R Spc^R Tc^S seleccionadas como posibles mutantes, seguían conservando el alelo silvestre puesto de manifiesto en un análisis por hibridación, en la estrategia de co-integración fue imposible la obtención de transconjugantes Km^R.

La imposibilidad de obtener un mutante en el gen SMc02163 parecía sugerir que este gen fuese esencial en las condiciones de laboratorio utilizadas. Si esta hipótesis fuera correcta, el intercambio alélico debería ser posible en un fondo que dispusiera de una copia intacta del gen SMc02163. Este tipo de estrategia ha sido utilizada para apoyar la esencialidad de algunos genes de *S. meliloti* como *mviN* y *glnD* (Rudnick *et al.*, 2001). Para ello, tanto el plásmido pPGI500 que contiene el gen SMc02163 bajo el control del promotor de Trp, como el pPGI400 donde el gen se encuentra clonado en sentido contrario, se introdujeron mediante conjugación en las cepas silvestres GR4 y 1021 de *S. meliloti*. A los cuatro tipos distintos de transconjugantes Tc^R se les transfirió

posteriormente el plásmido pSTEP4 y se procedió para cada uno de ellos, a seleccionar primero simples y luego dobles recombinantes, en medio mínimo con glicerol y KNO_3 siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.6 de Material y Métodos. Algunas de las colonias que presentaban el patrón de resistencia correspondiente al intercambio alélico y pérdida del vector suicida ($\text{Sm}^R/\text{Spc}^R/\text{Tc}^R/\text{Sac}^R/\text{Km}^S$) se analizaron mediante hibridación en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Como se observa en la Fig. R.I.13, el intercambio alélico fue posible en todas ellas, ya que la banda correspondiente al alelo silvestre desaparecía, detectándose sólo la banda correspondiente al alelo mutado (3,14 Kb) y la banda *EcoRI* de 1,08 Kb, de mayor intensidad, correspondiente a la copia de SMC02163 presente en las construcciones plasmídicas. Estos resultados eran la demostración de que la construcción pSTEP4 era correcta y apoyaban la hipótesis de la esencialidad de SMC02163, al menos en las condiciones de laboratorio utilizadas. A las colonias en las que se produjo el intercambio alélico las denominamos GR4 ó 1021 SMC02163::SmSpc (pPGI400) y SMC02163::SmSpc (pPGI500).

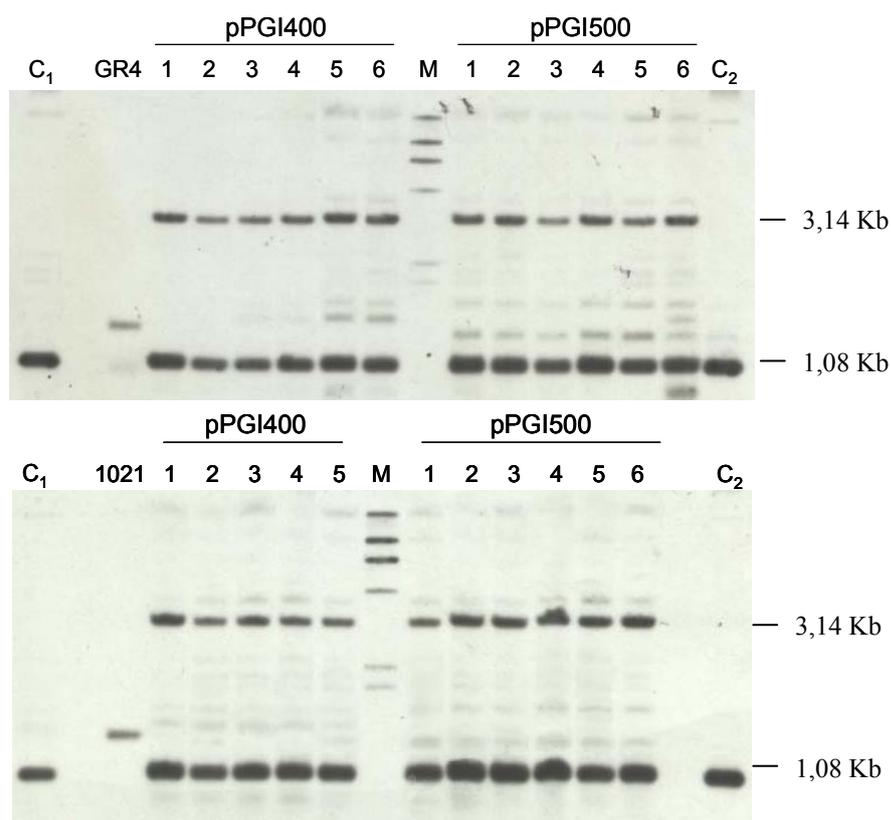


Figura R.I.13. Hibridación de ADN genómico digerido con *EcoRI* de posibles mutantes SMC02163 de cepas de *S. meliloti* que contienen el plásmido pPGI400 o pPGI500. Como sonda se usó un fragmento *EcoRI* de la construcción pPGI4. Carriles: C₁, plásmido pPGI400; C₂, plásmido pPGI500; M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-6, Derivados de GR4 o 1021 SMC02163::SmSpc

Una vez conseguido el intercambio alélico en el cromosoma de *S. meliloti*, intentamos obtener el mutante SMc02163, forzando la pérdida de la construcción que contenía la copia del gen en *trans*. Para este objetivo ya sólo se continuó con las cepas GR4 y 1021 SMc02163::SmSpc (pPGI500). Se intentaron tres estrategias:

a) En una primera estrategia, las cepas GR4 SMc02163::SmSpc (pPGI500) y 1021 SMc02163::SmSpc (pPGI500) se cultivaron durante 96 generaciones en medio líquido TY ó medio mínimo con glucosa y KNO₃ en ausencia de tetraciclina, ya que en ausencia de presión selectiva el plásmido tiene una cierta frecuencia de pérdida. Transcurrido el tiempo correspondiente a 96 generaciones, alícuotas del cultivo se sembraron en medio conteniendo Sm/Spc, para posteriormente seleccionar aquellas colonias que fuesen Sm^R/Spc^R/Tc^S. Como control, en paralelo se llevaron las cepas silvestres GR4 y 1021 conteniendo el plásmido pPGI500. El análisis de unas 150 colonias de cada tipo de bacteria, reveló que la pérdida del plásmido ocurría con una frecuencia del 20% en las cepas control, mientras que en las cepas portadoras del alelo mutado de SMc02163 (GR4 SMc02163::SmSpc y 1021 SMc02163::SmSpc), no se identificaron colonias Tc^S.

b) La segunda alternativa consistió en hacer uso del mecanismo de exclusión de plásmidos. Se conoce que los plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad genético son incapaces de coexistir en la bacteria debido al fenómeno de competencia por la maquinaria de replicación bacteriana. Con el fin de provocar la exclusión de la construcción pPGI500 en las cepas GR4 SMc02163::SmSpc y 1021 SMc02163::SmSpc, se les transfirió mediante conjugación el plásmido RP4-11 que pertenece al mismo grupo de incompatibilidad que pTE3 (IncP), pero que confiere resistencia a Km. Los transconjugantes se seleccionaron tanto en medio TY como en medio mínimo con glucosa y KNO₃, conteniendo Km. Aunque se consiguieron colonias Km^R Tc^S, el análisis por hibridación reveló la presencia aún del alelo silvestre.

c) El último intento para conseguir el mutante en SMc02163 consistió en llevar a cabo una transducción generalizada con fagos disponibles para *S. meliloti* 1021 (Finan *et al.*, 1984), usando como cepa donadora 1021 SMc02163::SmSpc (pPGI500) y como receptora 1021. La selección en medio LB suplementado con Sm y Spc permitió el crecimiento de 76 colonias. El análisis por hibridación del ADN genómico de 6 de esas colonias, reveló en todas ellas la presencia del alelo mutado y ausencia del silvestre (Fig. R.I.14). Este resultado, por tanto, descartaba la esencialidad del gen SMc02163 en *S. meliloti* 1021. Al mutante obtenido se le ha denominado 1021pgi.

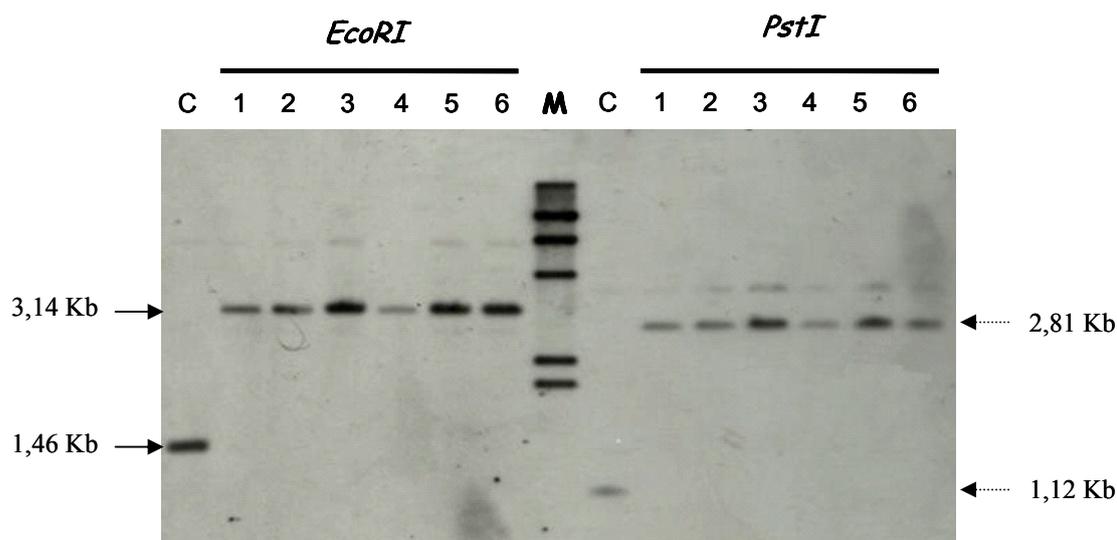


Figura R.I.14. Comprobación de mutantes SMC02163 de *S. meliloti* 1021 obtenidos por transducción, mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* (izquierda) y con *PstI* (derecha), usando como sonda un fragmento *EcoRI* del plásmido pPGI4. Carriles: C. 1021; 1–6. Mutantes SMC02163 de *S. meliloti* 1021.

4.3. Caracterización del mutante 1021pgi de *S. meliloti*

4.3.1. Actividad PGI

Para comprobar si el gen mutado en 1021 codifica una proteína con actividad PGI se llevó a cabo la determinación de esta actividad en extractos celulares obtenidos de la cepa silvestre y mutante *pgi* crecidas en medio LB suplementado de los correspondientes antibióticos. Como se muestra en la Figura R.I.15, la cepa mutante mostró una actividad significativamente inferior (unas 6 veces) a la obtenida para la cepa silvestre. Este resultado sugiere que aunque en *S. meliloti* se ha descrito la existencia de otras dos actividades PGI tipo cupin (Hansen *et al.*, 2005), en las condiciones experimentales ensayadas, la actividad de la proteína codificada por SMC02163 parece ser la predominante en la bacteria. Para comprobar si el defecto enzimático del mutante era consecuencia de la modificación genética realizada, decidimos analizar la actividad PGI en extractos de células del mutante 1021pgi al que previamente se le había transferido la construcción pPGI500 que contiene el gen SMC02163 bajo el control del promotor Trp, o bien el vector vacío pTE3 como control. La Fig. R.I.15 muestra como, a diferencia de pTE3, la presencia del plásmido pPGI500 fue capaz de recuperar el defecto en actividad mostrado por el mutante. El valor ligeramente superior en actividad PGI (1,7 veces) mostrado por 1021pgi (pPGI500) en

comparación con el mostrado por la cepa silvestre 1021, probablemente sea el resultado tanto del efecto extracopia del plásmido, como de la expresión fuerte y constitutiva del gen SMc02163 dirigida por el promotor Trp.

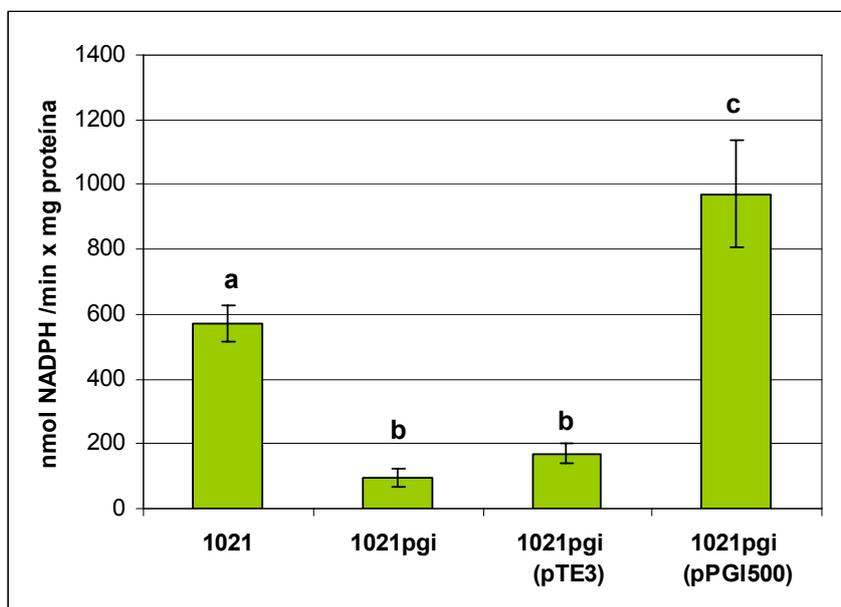


Figura R.I.15. Actividad PGI presente en extractos celulares de cepas silvestre y mutante *pgi* de *S. meliloti*. Los valores representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Crecimiento en distintas fuentes de carbono

Arias y colaboradores (1979) aislaron y caracterizaron un mutante derivado de la cepa L5-30 de *R. meliloti* carente de actividad PGI. El mutante era incapaz de utilizar manitol, sorbitol, fructosa, manosa, ribosa, arabitol o xilosa, pero sí podía crecer con glucosa, glicerol, arabinosa, piruvato y succinato. Este fenotipo asociado a la ausencia de PGI concuerda con los conocimientos existentes hoy sobre el metabolismo carbonado en *Rhizobium* (Fig. R.I.16) (Stowers, 1985; Gosselin *et al.*, 2001). En *S. meliloti* y en muchas especies de la familia *Rhizobiaceae* la ruta glucolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) se halla ausente por lo que la glucosa se degrada mayoritariamente a través de la ruta Entner-Doudoroff, que no requiere la participación de PGI. La degradación de glicerol, arabinosa, piruvato, y succinato dejan atrás el bloqueo metabólico de un mutante deficiente en actividad PGI, permitiendo su crecimiento. Esto no ocurre con los azúcares no utilizables en cuyo catabolismo se genera fructosa-6-P.

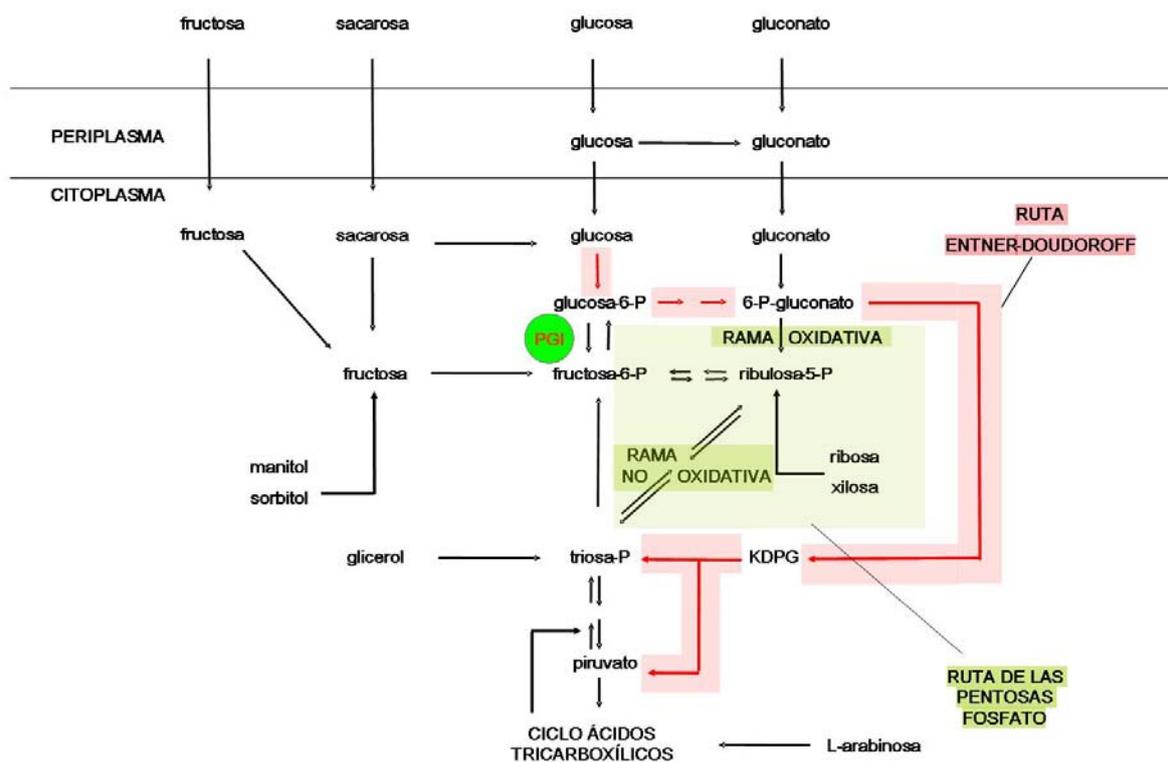


Figura R.I.16. Esquema del metabolismo de carbohidratos de *S. meliloti*. (Adaptado de Gosselin *et al.*, 2001). KDPG, 2-ceto-3-deoxi 6-fosfogluconato.

Los mismos autores comprobaron además que la presencia en el medio de fuentes de carbono no utilizables por el mutante, impedían el crecimiento de la bacteria a expensas de un carbohidrato utilizable. Así, en medios que contenían manitol y glicerol, o fructosa y glucosa, el mutante era incapaz de crecer. Este fenómeno lo atribuyen a la acumulación excesiva de metabolitos intermediarios, como fructosa 6-fosfato, que no pueden superar el bloqueo enzimático.

Para comprobar si el mutante 1021pgi mostraba un fenotipo similar, se ensayó su crecimiento tanto en medio mínimo líquido como sólido conteniendo KNO_3 como fuente de N y distintos compuestos como fuentes de carbono. Como se muestra en las Figuras R.I.17 y R.I.18, 1021pgi mostró un comportamiento similar al del mutante de Arias y colaboradores. La cepa mutante en SMc02163 fue capaz de crecer en presencia de glucosa, succinato y glicerol, mostrando en los dos primeros medios, una curva de crecimiento muy similar a la mostrada por la cepa silvestre. En cambio, el crecimiento del mutante 1021pgi estuvo inhibido cuando el manitol o la fructosa fueron las únicas fuentes de carbono (Fig. R.I.17). La inhibición del crecimiento en estos medios parecía disiparse tras largo tiempo de incubación, fenómeno que también fue

Capítulo I. RESULTADOS

observado en el mutante de Arias y colaboradores. Además, 1021pgi también mostró inhibición del crecimiento en medios que contenían una mezcla de carbohidratos utilizables y no utilizables, como se puede apreciar en la Fig. R.I.18 donde se representan las curvas de crecimiento mostradas por las cepas silvestre y mutante en medio mínimo conteniendo glucosa (0,5 %) y fructosa (0,5 %).

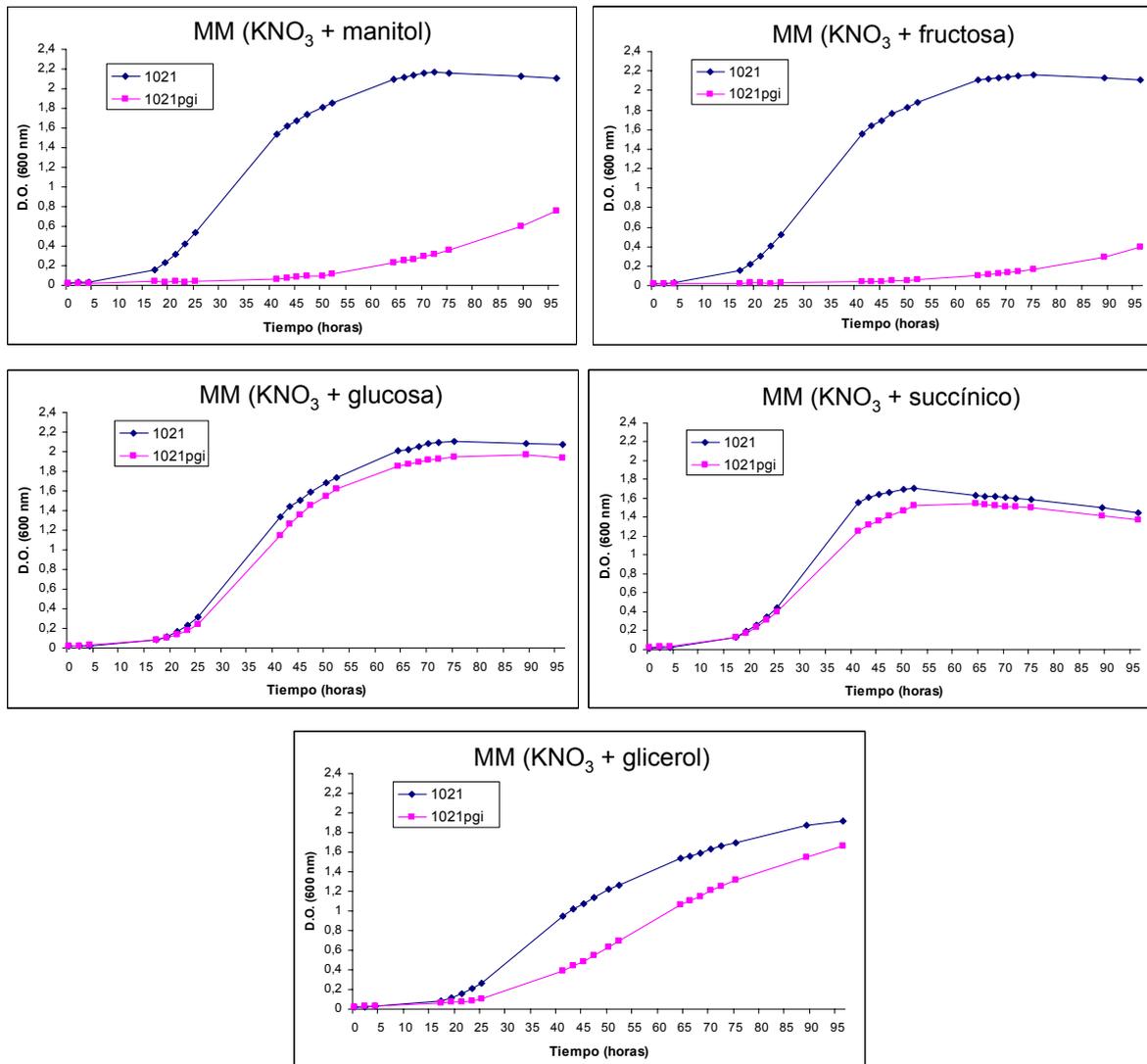


Figura R.I.17. Curvas de crecimiento de *S. meliloti* 1021 y el mutante 1021pgi en MM líquido con distintas fuentes de carbono (0,5 %).

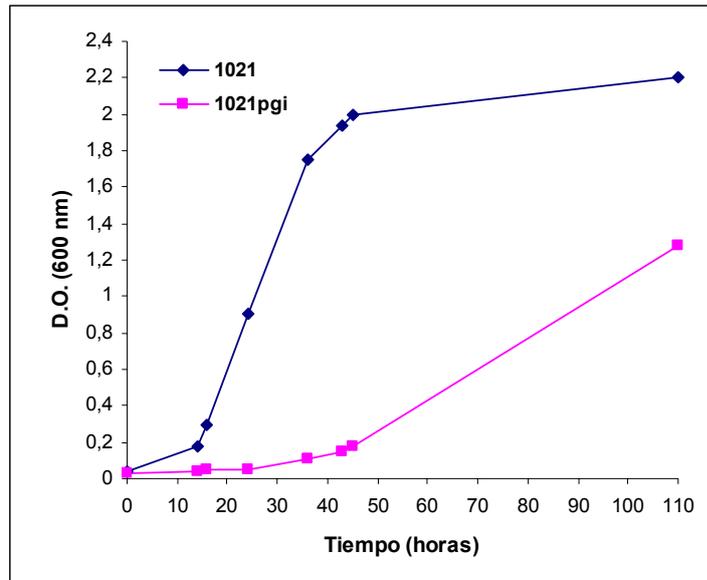


Figura R.I.18. Crecimiento de 1021 y 1021pgi en MM con mezcla de glucosa (0,5 %) y fructosa (0,5 %) como fuentes de carbono.

Es interesante destacar el hecho de que aunque 1021pgi muestra una curva de crecimiento muy similar a la de la cepa silvestre en medio mínimo líquido con glucosa como única fuente de carbono (Fig. R.I.17), en medios ricos y complejos como TY o LB, el mutante crece más lentamente durante la fase exponencial, alcanzando la fase estacionaria unas 10-15 horas después que la cepa silvestre (Fig. R.I.19). Este retraso en el crecimiento podría ser consecuencia de la interferencia causada por metabolitos no utilizables que se encuentren presentes en estos medios.

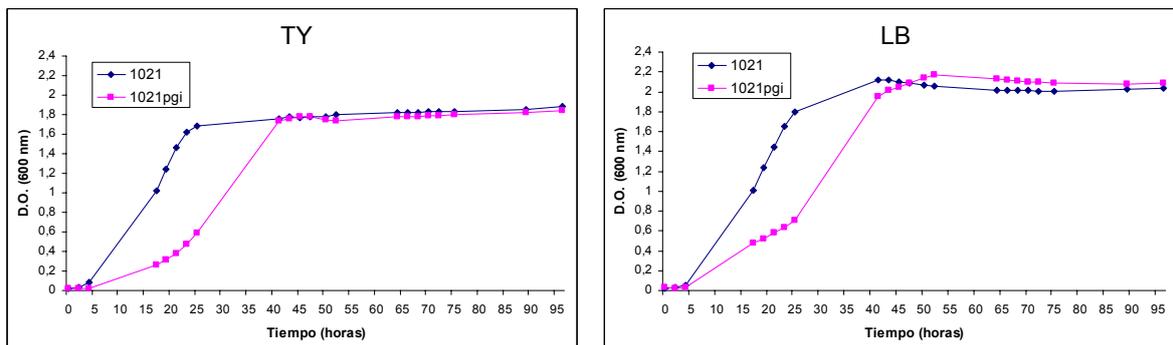


Figura R.I.19. Curvas de crecimiento de *S. meliloti* 1021 y 1021pgi en TY y LB líquidos. Datos de un experimento representativo de al menos 2 repeticiones.

4.3.3. Implicación del gen *pgi* en el control del swarming en *S. meliloti*

El gen *fadD*, situado aguas arriba del gen SMc02163, ha sido implicado en el control de aparición de migración multicelular o swarming en *S. meliloti* (Soto *et al.*, 2002). Una mutación por pérdida de función en el gen *fadD* de la cepa GR4, provoca la aparición de swarming condicional en MM semisólido, mientras que en el mismo medio la cepa silvestre es incapaz de mostrar este tipo de motilidad social. Además, recientemente se ha descrito que una mutación en el gen *pgi* de *E. coli*, causa una fuerte represión del swarming en esta bacteria, mientras que no parece alterar la capacidad de swimming (Inoue *et al.*, 2007). Este hecho ha sido explicado por los autores como que el metabolismo de la glucosa a través de la ruta glucolítica proporciona a esta bacteria la energía necesaria para el swarming.

Para comprobar si el gen SMc02163 desempeña algún papel en la aparición del swarming en *S. meliloti*, se comparó la motilidad de la cepa silvestre 1021 y el mutante 1021*pgi* en condiciones inductoras de este tipo de migración. La aparición de swarming en el mutante *fadD* de GR4 tiene lugar en MM semisólido (0.6% agar) con manitol y glutamato como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, y es inhibida por la presencia de glucosa. Dado que el mutante 1021*pgi* es incapaz de utilizar el manitol, para el ensayo de motilidad se sustituyó el manitol por glicerol. La cepa silvestre 1021, a diferencia de GR4, si es capaz de desarrollar swarming en MM semisólido (M. J. Soto, datos no publicados y Fig. R.I.20). Como se puede apreciar en la Fig. R.I.20, el mutante 1021*pgi* muestra una motilidad similar a la de la cepa silvestre, lo que sugiere que a diferencia de *E. coli*, el gen *pgi* de *S. meliloti* no parece ser esencial en la aparición de swarming en esta bacteria. La sobre-expresión del gen mediante presencia de la construcción pPGI500, tampoco parece alterar el swarming de la bacteria (datos no mostrados).

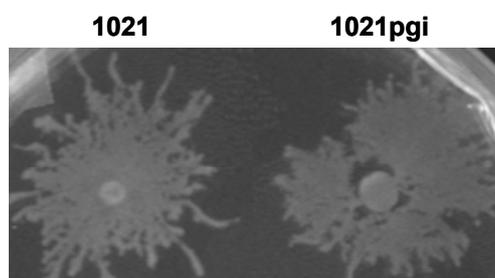


Figura R.I.20. Swarming de la cepa silvestre 1021 y el mutante 1021*pgi* de *S. meliloti* en placas de MM semisólido y glicerol 0,5 % como fuente de carbono.

4.3.4. Producción de exopolisacáridos (EPS)

Los dos únicos casos descritos en la literatura de mutantes de *Rhizobium* defectivos en actividad PGI, han resultado ser defectivos en la producción de EPS (Arias *et al.*, 1979; Raleigh & Signer, 1982). Decidimos comprobar si éste también era el caso del mutante 1021pgi. Para ello, cepa silvestre, mutante y mutante conteniendo la construcción pPGI500 se crecieron en MM con KNO₃ como fuente de N, y succinato como fuente de carbono. La cepa 1021pgi (pTE3) no pudo incluirse en el ensayo al presentar graves problemas de crecimiento en estas condiciones. Como control del proceso de aislamiento y cuantificación de EPS, se introdujo la cepa RmH4a, un mutante *exoA* derivado de 2011, deficiente en la producción de succinoglucano o EPSI (Becker *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla R.I.1, revelan que en nuestras condiciones experimentales, el mutante *exoA* produce 5 veces menos EPS que 1021, niveles que probablemente son reflejo de su defecto en biosíntesis de EPSI. La cepa 1021pgi sólo muestra una ligera reducción en la cantidad de EPS detectándose el 72% del polisacárido sintetizado por la cepa silvestre. Es especialmente llamativo el valor obtenido en el caso del mutante que contiene la construcción pPGI500, en el que los niveles de EPS llegan a ser 139 veces superiores a los obtenidos con 1021. No hemos investigado en este trabajo la naturaleza del polisacárido o polisacáridos responsables de tal incremento.

Tabla R.I.1.-Producción de polisacárido extracelular en cepas de *S. meliloti*.

Cepa	Polisacárido ^a (µg glucosa/ 10 ⁹ células)
1021	26,4 ± 1,8
1021pgi	19,1 ± 1,2
1021pgi (pPGI500)	3673,1 ± 257,5
RmH4a	5,1 ± 1,2

^a Los datos representan la media y error estándar de 3 medidas.

4.3.5. Capacidad de osmoadaptación

En *E. coli* una mutación en el gen *pgi* dificulta la adaptación a un estrés hiperosmótico, y conlleva una mayor expresión basal de genes osmorregulados como *otsBA* (implicados en la síntesis del osmoprotector trehalosa), pero menor inducibilidad osmótica de éstos (Böhringer *et al.*, 1995). Con objeto de comprobar si éste también era

el caso para el gen SMc02163 de *S. meliloti*, se abordaron los correspondientes experimentos. Por un lado, hemos comparado la capacidad de osmoadaptación del mutante 1021pgi con respecto a la cepa silvestre en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl. Estudios realizados por otros miembros del grupo de investigación han revelado que en medio mínimo con manitol y glutamato como fuentes de carbono y nitrógeno, *S. meliloti* 1021 es incapaz de crecer en presencia de 700 mM de NaCl y se encuentra muy afectada con 600 mM, mientras que la presencia de 200 mM de sal apenas tiene efecto sobre la capacidad de crecimiento de la bacteria (Domínguez-Ferreras, 2007). Puesto que 1021pgi es incapaz de utilizar manitol como fuente de carbono, se ensayó su capacidad de osmoadaptación en un medio mínimo que contenía glucosa y KNO₃, en lugar de manitol y glutamato, en respuesta a dos concentraciones de NaCl (400 y 500 mM) (Fig. R.I.21).

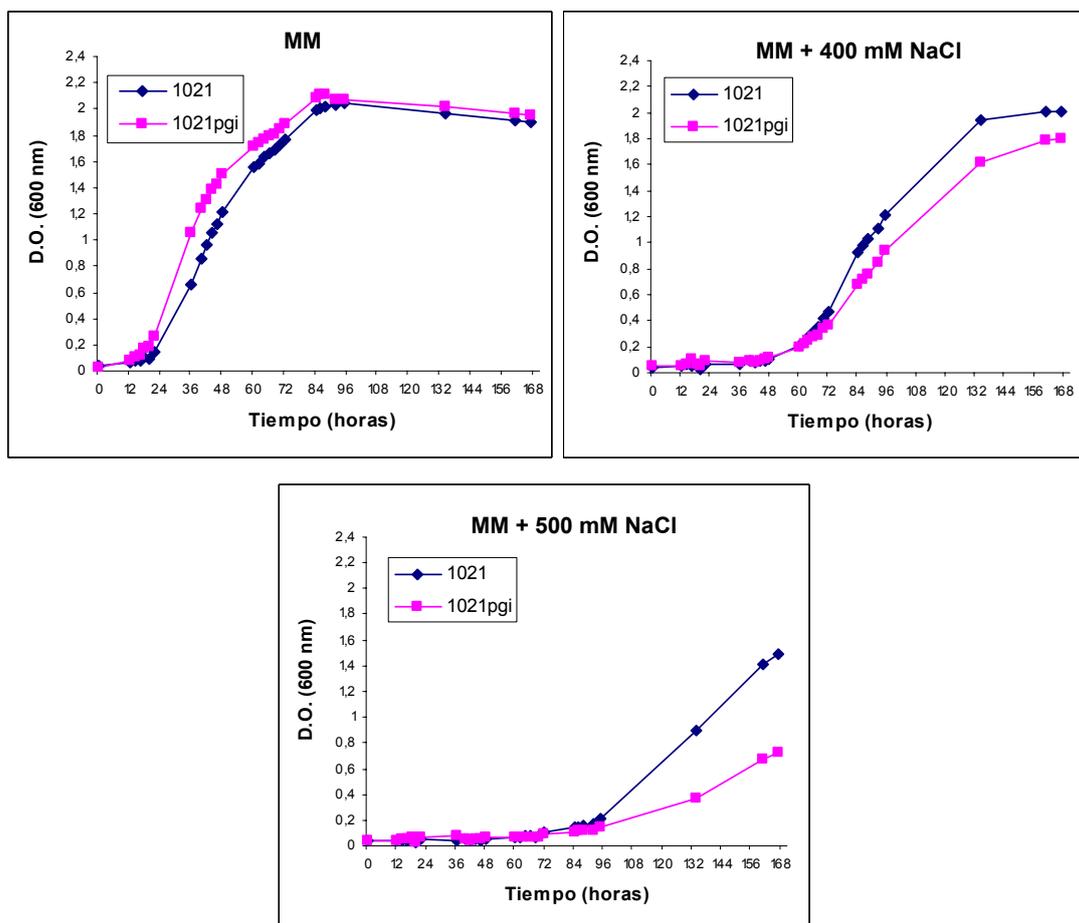


Figura R.I.21. Influencia de distintas concentraciones de NaCl en las curvas de crecimiento de la cepa silvestre y mutante *pgi* de *S. meliloti* en MM (KNO₃ + glucosa). Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes.

Mientras que en el medio sin sal, las cepas silvestre y mutante mostraban un crecimiento similar, la adición de 400 mM de NaCl provocó que 1021pgi quedase algo retrasada con respecto a la cepa silvestre, retraso que fue mucho más considerable en el medio adicionado de 500 mM de sal. Estos resultados parecen sugerir que al igual que en *E. coli*, el gen SMc02163 (*pgi*) de *S. meliloti* contribuye de alguna manera a la capacidad de osmoadaptación de la bacteria.

Por otro lado, recientemente en nuestro grupo se ha comprobado en estudios transcriptómicos que el gen homólogo a *otsA* de *S. meliloti* se induce en respuesta a un estrés osmótico provocado por la adición de sal o sacarosa. (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). Además, mediante el uso de una fusión transcripcional *otsA::uidA* se ha demostrado que la adición de 400 mM de NaCl al medio mínimo (manitol + glutamato) provoca un ligero incremento en la expresión del gen (2-3 veces) al comienzo de la fase exponencial de crecimiento, bajando posteriormente a los niveles observados en medio sin sal (Domínguez-Ferreras, 2007). Para comprobar si al igual que en *E. coli*, la expresión del gen *otsA* se ve influenciada por la existencia de un gen *pgi* funcional, el plásmido p53otsA conteniendo la fusión transcripcional *otsA::uidA*, se transfirió tanto a la cepa silvestre 1021 como mutante 1021pgi de *S. meliloti*. El nivel de expresión se analizó en células en fase exponencial de crecimiento (D.O.₆₀₀: 0,6-1), crecidas en MM con o bien glucosa o bien glicerol como fuentes de carbono en ausencia y presencia de 400 mM de NaCl (Fig. R.I.22).

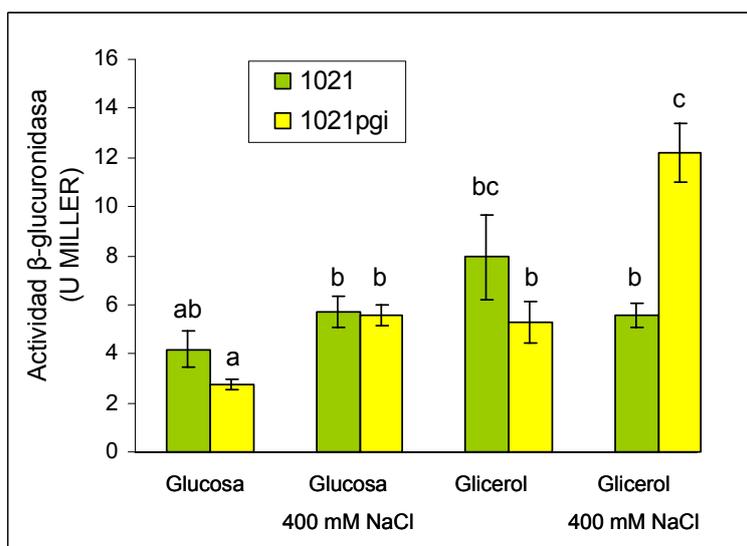


Figura R.I.22. Expresión de la fusión transcripcional *otsA::uidA* en *S. meliloti* 1021 y 1021pgi en medios con glucosa o glicerol, en ausencia y presencia de 400 mM NaCl. Los datos representan la media y

desviación estándar de al menos 5 medidas correspondientes a 3 experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

La razón de usar dos medios distintos se basó en la idea de crear dos situaciones en las que la teórica capacidad del mutante de sintetizar trehalosa a través del sistema OtsA, fuese distinta. Así, mientras en un medio con glucosa, la síntesis de trehalosa a través del sistema OtsA (que utiliza UDP-glucosa y glucosa-6-P como precursores) no debe estar comprometida, en un medio con glicerol, sí. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R.I.22.

En las condiciones ensayadas, la expresión del gen *otsA* en la cepa silvestre fue muy similar independientemente de cuál fuera el medio y de la presencia o no de NaCl. En el caso del mutante, la naturaleza de la fuente de carbono sí parece tener influencia en la expresión basal del gen *otsA*, siendo ésta mayor en medio con glicerol. Además, nuestros resultados contrastan con lo observado en *E. coli*: por un lado, la expresión basal de *otsA* en el mutante *pgi* fue similar o ligeramente inferior a la mostrada por 1021; por otro, mientras en la cepa silvestre no hubo inducibilidad del gen en respuesta a sal, sí que la hubo en el mutante en las dos condiciones experimentales ensayadas. No obstante, mientras en el medio con glucosa, la inducción del gen en el mutante en respuesta a la adición de sal consigue igualar la expresión observada en la cepa silvestre, en medio con glicerol el estrés hipersalino conlleva que la expresión del gen *otsA* sea 2 veces superior en el fondo mutante que en el silvestre en las mismas condiciones. Por tanto, la ausencia de un gen *pgi* funcional parece alterar la expresión del gen *otsA* en respuesta a determinadas condiciones hiperosmóticas.

4.3.6 Eficiencia de nodulación y fijación de nitrógeno

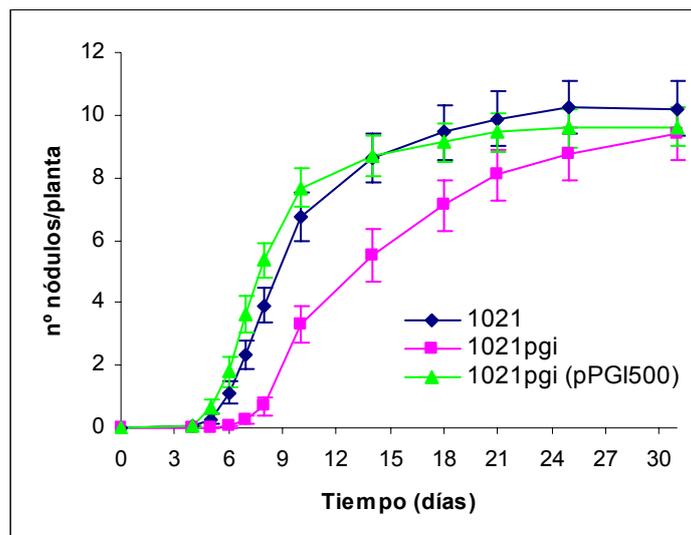
Existen varios ejemplos en la literatura en los que la carencia de actividad PGI en una bacteria se ha relacionado con un defecto en la interacción del microbio con un hospedador eucariota. Tal y como se describió en el apartado 4.2 de este capítulo, mutantes de *Rhizobium* defectivos en actividad PGI (aunque no caracterizados a nivel genético), han mostrado defectos simbióticos. Así, mientras el mutante de *R. meliloti* resultó ser menos eficiente en fijación de nitrógeno (Arias *et al.*, 1979), el mutante de *R. phaseoli* fue incapaz de nodular plantas de judía (Raleigh & Signer, 1982). Pero la relación entre actividad PGI e interacción con un hospedador no parece ser exclusiva de microorganismos mutualistas. Así, mutantes *pgi* de *X. axonopodis* pv. *citri* son

incapaces de crecer y desarrollar enfermedad en hojas de cítricos (Tung & Kuo, 1999), mientras en *X. oryzae* pv. *oryzae*, la mutación reduce la virulencia de la bacteria en arroz ((Tung & Kuo, 1999; Tsuge *et al.*, 2004).

Con objeto de investigar si el gen SMc02163 tiene un papel en el establecimiento de la simbiosis mutualista, el fenotipo simbiótico de la cepa 1021pgi se analizó inoculando plantas de alfalfa y determinando tanto su capacidad infectiva, competitiva como de fijación de nitrógeno. *S. meliloti* 1021pgi es capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de alfalfa. No obstante, la comparación de las cinéticas de nodulación de las cepas silvestre y mutante puso de manifiesto una clara diferencia en infectividad entre las dos bacterias. Como se aprecia en la Figura R.I.23A, 1021pgi es más lenta que la cepa silvestre en inducir la formación de nódulos en raíces de alfalfa, aunque transcurridas 3-4 semanas después de la inoculación, el número medio de nódulos desarrollados por planta es el mismo independientemente de la cepa con la que se haya inoculado. Este retraso en la cinética de nodulación de 1021pgi parece ser consecuencia de la mutación en el gen SMc02163, ya que el fenotipo desaparece cuando la construcción pPGI500 se encuentra presente en el mutante.

Para analizar la capacidad competitiva de 1021pgi, doce plantas de alfalfa se inocularon con una mezcla de 1021pgi x 1021 (pGUS3) en proporción 1:1, determinándose el porcentaje de nódulos ocupados por cada una de las cepas 15 días después de la inoculación. En paralelo, se realizó la inoculación con la mezcla control 1021 x 1021 (pGUS3), así como con 1021pgi (pPGI500) x 1021 (pGUS3) en cada una de las mezclas ensayadas. En la Figura R.I.23B se representa el porcentaje de nódulos blancos, o lo que es lo mismo, el porcentaje de nódulos ocupados por 1021pgi, 1021 y 1021pgi (pPGI500). Como era de esperar dado el retraso observado en la cinética de nodulación, la cepa 1021pgi resultó ser menos competitiva por la nodulación que la cepa silvestre, siendo el porcentaje de nódulos ocupados por 1021pgi aproximadamente la mitad de los ocupados por 1021. Al igual que la capacidad infectiva, el defecto en competitividad mostrado por 1021pgi pudo ser restaurado con la presencia del plásmido pPGI500, obteniéndose un porcentaje de ocupación de nódulos muy similar al obtenido con 1021.

A



B

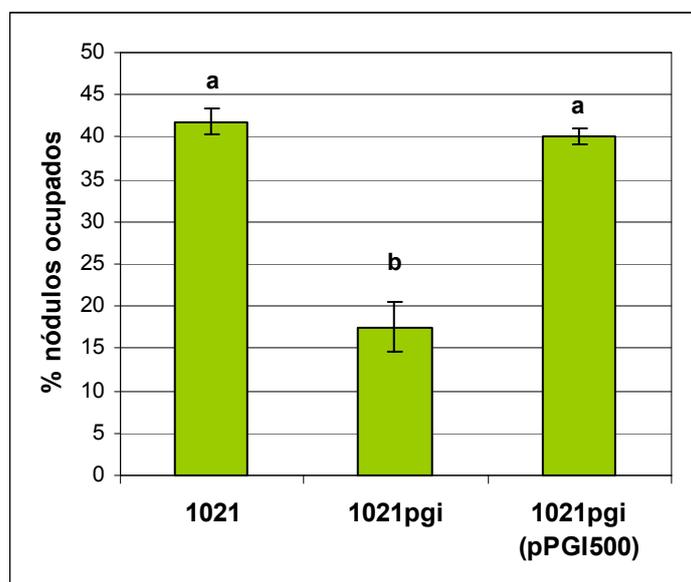


Figura R.I.23. Capacidad infectiva y competitiva de cepas de *S. meliloti*. **A)** Cinética de nodulación. Los valores en cada curva representan la media y error estándar obtenidos de 24 plantas. Se muestra un ejemplo representativo de al menos tres experimentos independientes. **B)** Porcentaje de ocupación de nódulos de las cepas de estudio tras coinocular con 1021 (pGUS3) en una proporción 1:1. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$). Los valores corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes con 12 plantas cada uno.

Con objeto de analizar la contribución de SMc02163 a la eficiencia fijadora de la bacteria se llevaron a cabo medidas del peso seco y contenido en nitrógeno de la parte aérea, así como medidas de actividad reductora de acetileno (ARA) de plantas

inoculadas con la cepa silvestre, mutante 1021pgi y mutante conteniendo la construcción pPGI500 (Fig. R.I.24).

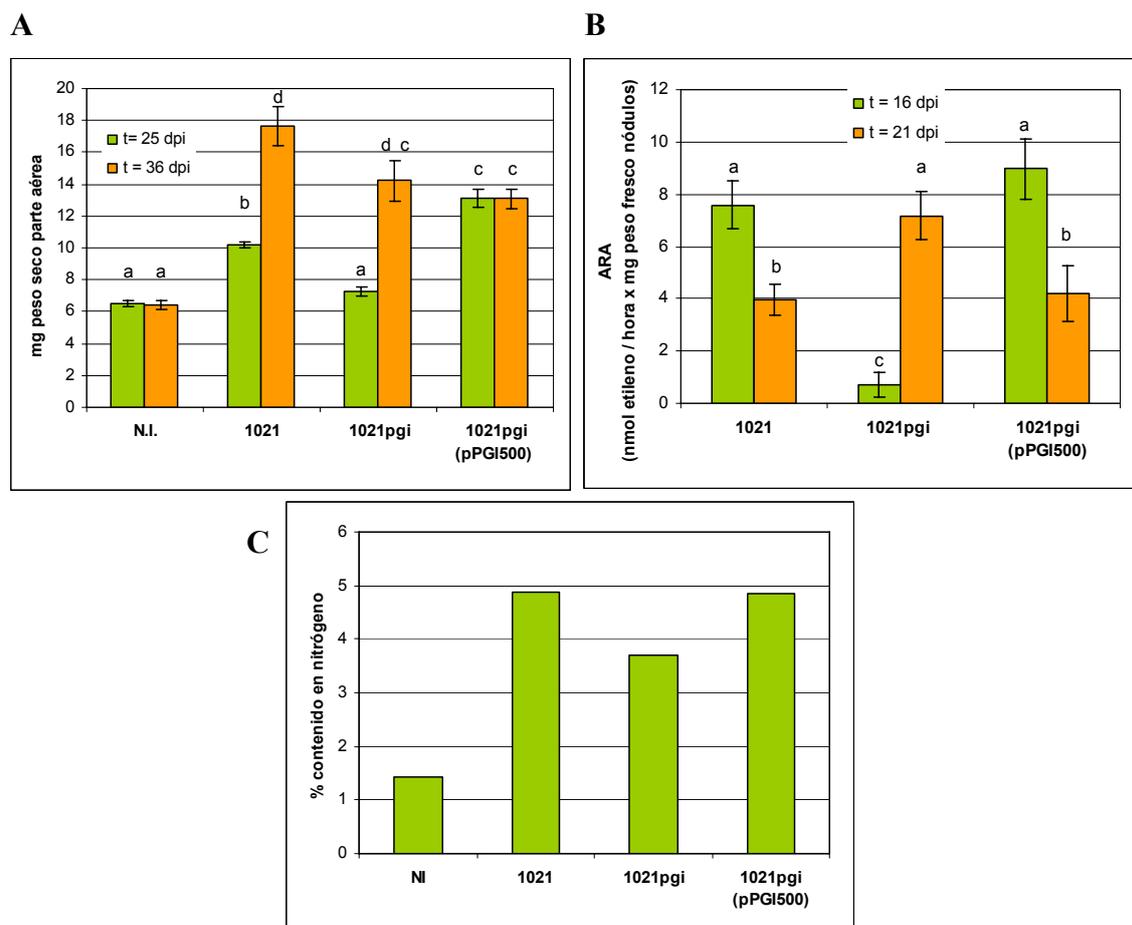


Figura R.I.24. Eficiencia fijadora de distintas cepas de *S. meliloti* determinada mediante (A) medida del peso seco de parte aérea, (B) actividad reductora de acetileno (ARA) y (C) contenido en N de plantas de alfalfa. NI, No Inoculada. Valores correspondientes a la media de un total de 24 plantas por cada cepa en al menos dos ensayos independientes. Se representa el valor (contenido en N) o media y error estándar de 24 plantas. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

La medida del peso seco de la parte aérea (PSPA) se realizó 25 y 36 días después de la inoculación (dpi) (Fig. R.I.24A). En las dos determinaciones, el PSPA de las plantas inoculadas con el mutante fue inferior al mostrado por plantas inoculadas con la cepa silvestre, aunque a los 36 días las diferencias ya no son estadísticamente significativas. En la medida realizada 25 dpi, el valor obtenido en plantas inoculadas con 1021pgi fue incluso muy similar al mostrado por plantas control no inoculadas. En la segunda medida (36 dpi), dicho valor se incrementa con respecto a las plantas control, alcanzando un valor más próximo al mostrado por plantas inoculadas con 1021. La presencia de pPGI500 en el mutante consigue que 25 dpi el PSPA de plantas inoculadas

con esta bacteria sea no sólo superior al mostrado por plantas inoculadas con 1021pgi, sino incluso al de aquellas inoculadas con la cepa silvestre. Este valor, sin embargo no se incrementó en la medida realizada 36 dpi, donde el mayor PSPA se detectó en plantas inoculadas con la cepa silvestre.

El análisis del contenido en N presente en la parte aérea de plantas, realizado a los 25 días después de haber inoculado con las distintas cepas de estudio, básicamente confirma los resultados de PSPA anteriormente mencionados (Figura R.I.24C). El contenido en N detectado en plantas inoculadas con 1021pgi fue superior al de las no inoculadas, demostrando que la bacteria es capaz de fijar N. No obstante, el valor fue inferior al mostrado por plantas inoculadas con 1021 ó 1021pgi (pPGI500), sugiriendo un defecto simbiótico. No hemos comprobado si igual que el PSPA, el contenido en N de las plantas inoculadas con 1021pgi se recupera en un tiempo posterior. A diferencia de lo observado con el PSPA no se han apreciado diferencias apreciables en contenido en N de las plantas inoculadas con 1021pgi (pPGI500) ó 1021.

Además, hemos determinado la actividad nitrogenasa presente en plantas 16 y 21 días después de haber sido inoculadas con cada una de las cepas de estudio, mediante medidas de la actividad reductora de acetileno (ARA). Como se puede apreciar en la Figura R.I.24B la actividad de plantas inoculadas con el mutante 1021pgi fue muy inferior (unas 10 veces) a la existente en plantas inoculadas tanto con la cepa silvestre como con 1021pgi (pPGI500), 16 dpi. Sin embargo, la medida realizada 21 dpi, revela que la actividad ARA presente en plantas inoculadas con el mutante se ha incrementado hasta alcanzar los valores obtenidos 16 dpi en plantas inoculadas con la cepa silvestre o mutante complementado, mientras que en éstas la actividad ARA se ha reducido aproximadamente a la mitad, probablemente indicando una posible entrada en senescencia de los nódulos de estas plantas, consecuencia del sistema utilizado (cultivo hidropónico en tubos).

Para completar el estudio del fenotipo simbiótico del mutante 1021pgi, se decidió analizar posibles alteraciones a nivel estructural y ultraestructural de nódulos inducidos por esta cepa en plantas de alfalfa, mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. Este objetivo se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Mercedes Lucas del Centro de Ciencias Medioambientales ((CSIC), Madrid). Se estudiaron secciones de nódulos inducidos por la cepa silvestre 1021 y mutante 1021pgi, en plantas de alfalfa crecidas en cultivo hidropónico 33 y 40 días después de la inoculación (dpi).

En general, la estructura de los nódulos inducidos por la cepa silvestre o la mutante 33 dpi fue muy similar, observándose en ambos las zonas de desarrollo típicas de nódulos indeterminados (Fig. R.I.25). No obstante, mientras los nódulos inducidos por la cepa silvestre presentaron una zona IV extensa, con claros síntomas de senescencia, en los nódulos inducidos por la cepa mutante la zona IV no parece haberse desarrollado, ya que tanto la extensión como el número de células con síntomas de senescencia fue inferior comparado con lo observado en los nódulos control. Otra pequeña diferencia se pudo observar en la zona III, donde la proporción de células intersticiales presente en los nódulos inducidos por el mutante parecía ser superior a la observada en nódulos control, aunque no se ha realizado un análisis estadístico que pudiera confirmar esta observación. En nódulos de 40 dpi inducidos por el mutante, los síntomas de senescencia de la zona IV son más abundantes (Fig. R.I.25C).

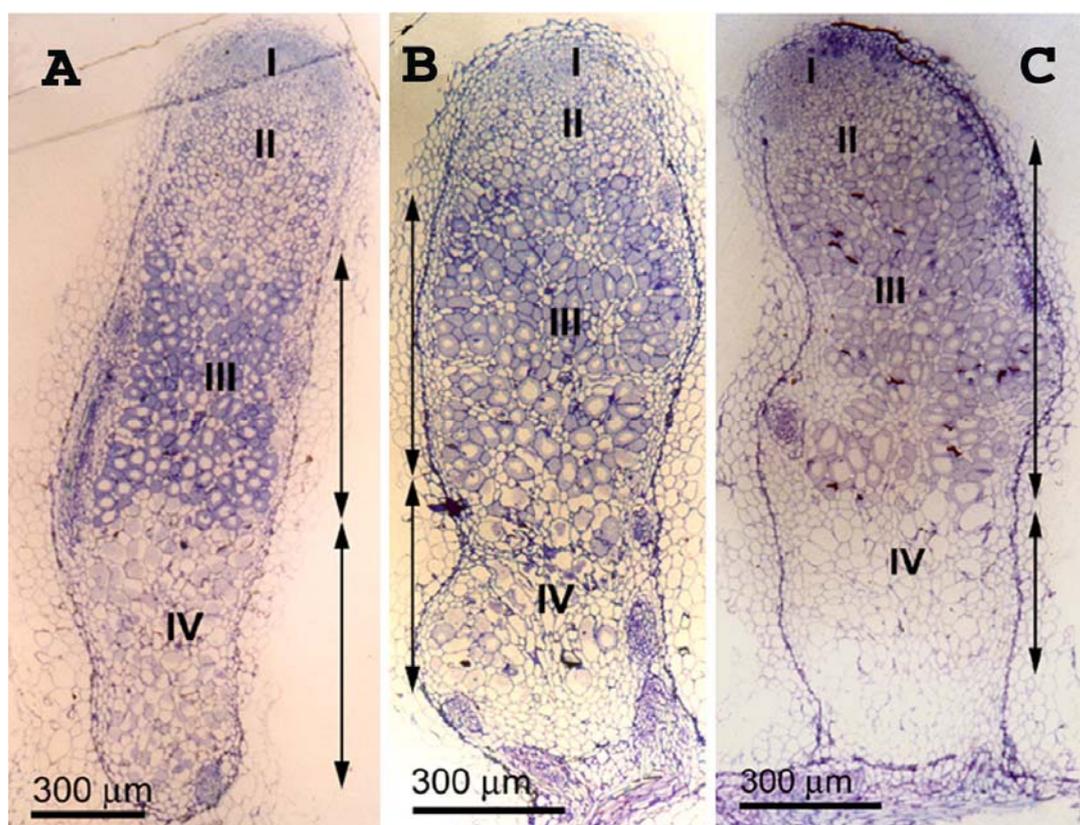


Figura R.I.25. Estructura al microscopio óptico de secciones longitudinales de nódulos de alfalfa inducidos por la cepa silvestre 1021 (A) y mutante 1021pgi (B y C) de *S. meliloti*. A y B son nódulos aislados 33 dpi, C nódulo de 40 dpi. Se indican las zonas meristemática (I), de infección (II), de fijación (III) y senescente (IV).

El análisis por microscopía electrónica ha revelado que los nódulos inducidos por 1021 y 1021pgi presentan características ultraestructurales semejantes, tanto a nivel de canales de infección, como a nivel de diferenciación de bacterias a bacteroides, observándose bacteroides funcionales tipo IV en las células vegetales de la zona III. Quizás sólo cabría destacar que, con cierta frecuencia, bacteroides de 1021pgi mostraron la presencia de abundantes vesículas en las proximidades de la envoltura celular llegando a fusionarse a veces con la membrana interna bacteriana (Fig. R.I.26C). El contenido y significado de la presencia de estas vesículas que nunca se observaron en bacteroides de la cepa silvestre, hasta el momento es desconocido. Además, la escasa existencia de síntomas de senescencia en nódulos de 33 dpi inducidos por la cepa mutante ha sido confirmada a nivel ultraestructural. Así, en los nódulos inducidos por la cepa silvestre, el grado de senescencia es máximo en la zona IV de nódulos de 33 dpi, donde las células poseen bacteroides tipo V con citosol alterado llegando finalmente a colapsar dando lugar a simbiosomas que simplemente contienen membranas de los bacteroides (Fig. R.I.26E). Por el contrario, en las escasas células senescentes observadas en los nódulos formados por la cepa mutante, la desintegración total del citoplasma aún no se ha producido (Fig. R.I.26D). En nódulos de 40 dpi, ya es posible encontrar células infectadas completamente senescentes (datos no mostrados).

En resumen, la mutación en el gen SMc02163 de *S. meliloti* aunque permite la inducción de nódulos fijadores en alfalfa, provoca un retraso en el proceso infeccioso que afecta negativamente la capacidad competitiva y eficiencia fijadora de la bacteria.

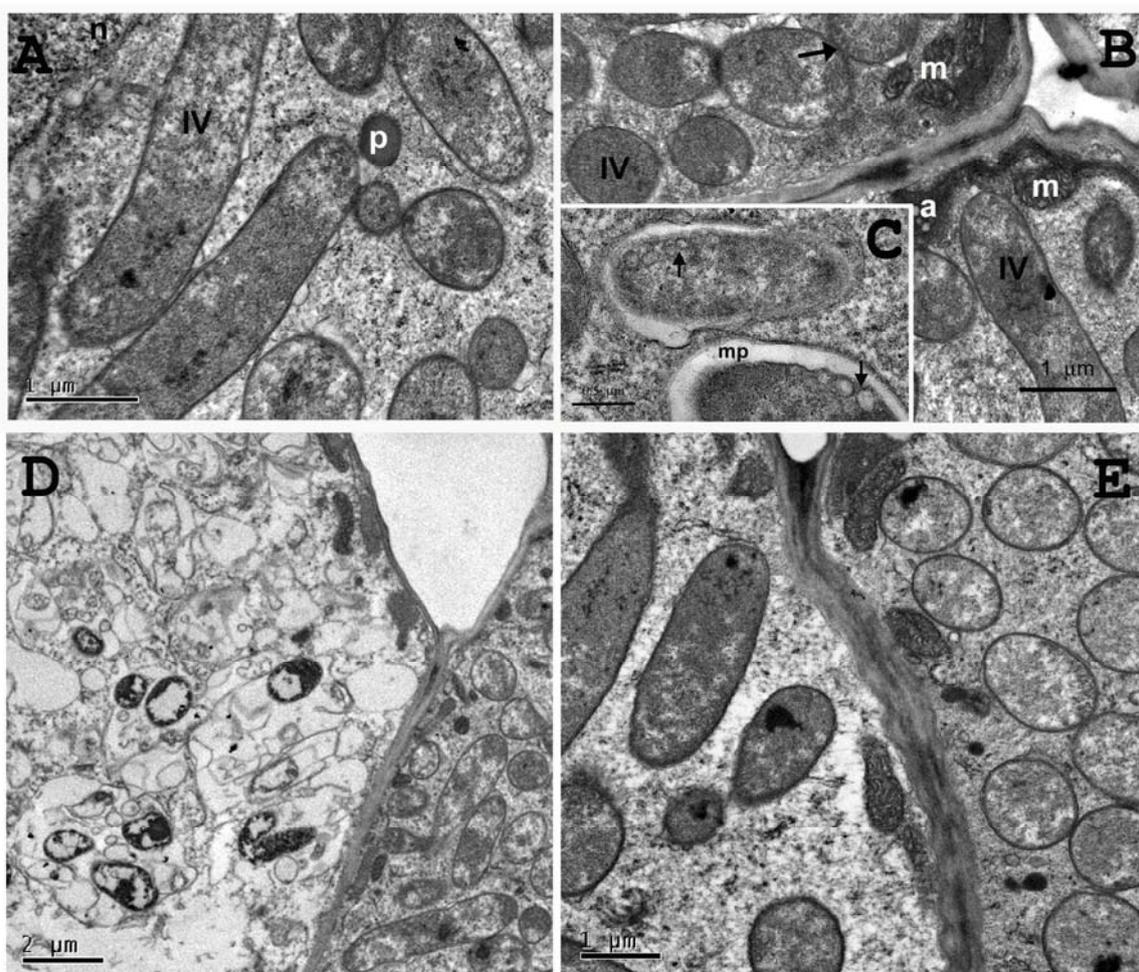


Figura R.I.26. Ultraestructura de nódulos de alfalfa 33 dpi inducidos por cepa silvestre y mutante 1021pgi de *S. meliloti*. Bacteroides tipo IV de 1021 (A) y 1021pgi (B) presentes en zona III del nódulo. C) Detalle de las vesículas de naturaleza desconocida en bacteroides de la cepa mutante, mostradas con flecha. D) Zona IV de nódulo inducido por 1021 mostrando célula vegetal con síntomas de senescencia. E) Zona IV de nódulo inducido por 1021pgi.

4.3.7. Expresión de genes *nod*

En un intento por identificar las causas del gran defecto en infectividad mostrado por el mutante 1021pgi se decidió analizar el nivel de expresión de los genes *nod* de la bacteria, responsables de la síntesis y secreción del factor Nod clave en el proceso de infección y organogénesis del nódulo. Para ello, se introdujeron en la cepa silvestre y en el mutante 1021pgi los plásmidos pRmM57 y pGD499 portadores de una fusión transcripcional *nodC::lacZ* y de una fusión *npt::lacZ* de expresión constitutiva, respectivamente. La determinación de actividad β -galactosidasa se realizó en cultivos crecidos en medio mínimo con KNO_3 como fuente de nitrógeno, y glucosa o succínico como únicas fuentes de carbono, en ausencia y presencia de luteolina (inductor de genes

nod de *S. meliloti*). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. R.I.27. Se pudo comprobar que la expresión de la fusión transcripcional *npt::lacZ* en la cepa mutante fue inferior a la obtenida en la cepa silvestre en todas las condiciones ensayadas. Esto podría sugerir un defecto general en transcripción como consecuencia de la mutación en el gen SMc02163. A pesar de ello, la expresión del gen *nodC* en respuesta a luteolina fue superior en el mutante que en la cepa silvestre en los dos medios ensayados. Resultados similares se han obtenido utilizando exudados radicales de plantas de alfalfa como inductores de los genes *nod* (datos no mostrados). Estos resultados sugieren por tanto, que el retraso en la inducción de nódulos observado para la cepa 1021pgi no es consecuencia de una menor expresión de los genes *nod*.

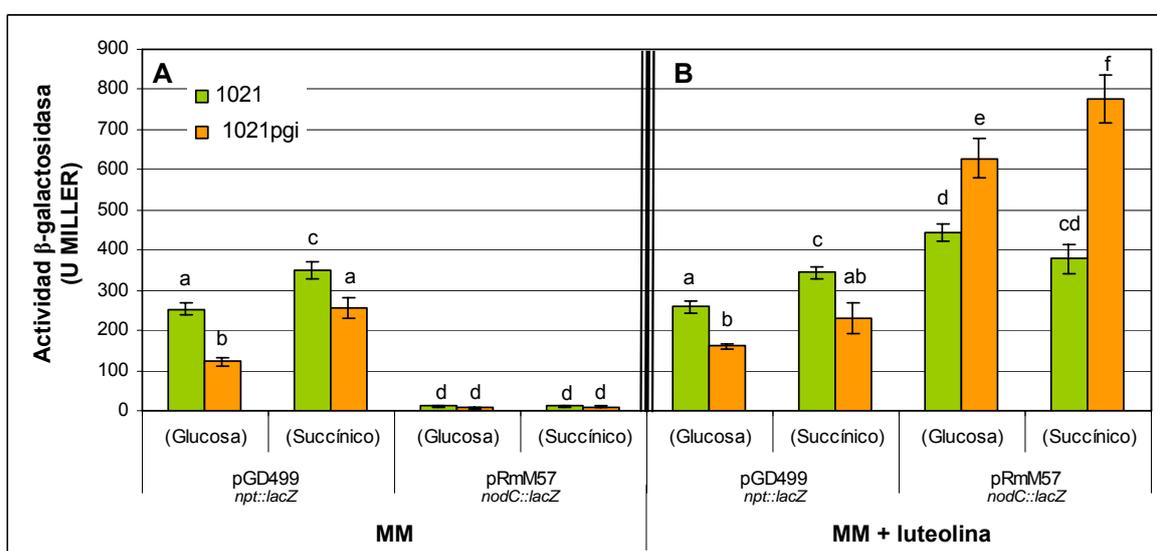


Figura R.I.27. Actividad β-galactosidasa presente en las cepas 1021 y 1021pgi *S. meliloti* conteniendo las fusiones transcripcionales *npt::lacZ* y *nodC::lacZ*, crecidas en dos fuentes de carbono distintas y en ausencia (A) o presencia (B) del inductor luteolina (5 μM). Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

4.3.8. Adsorción y colonización a raíces de alfalfa

Es conocido que condiciones ambientales y mutaciones genéticas que dificultan el proceso de adsorción de la bacteria a la superficie de la raíz y su posterior colonización, provocan un retraso en la cinética de formación de nódulos (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 2004). Para comprobar si el retraso en la aparición y desarrollo de nódulos inducidos por el mutante 1021pgi eran consecuencia de un defecto en alguna de estas etapas tempranas de la simbiosis, decidimos analizar la capacidad de adsorción y colonización de 1021pgi en raíces de alfalfa, y compararla con la mostrada por la cepa silvestre.

La capacidad de adsorción o adhesividad (A) tal y como se describe en el apartado 4.4 de Material y Métodos se determinó como el porcentaje de bacterias de una suspensión inicial de $2-3 \times 10^4$ ufc/ml que quedan íntimamente adheridas a las raíces de 15 plántulas de alfalfa tras 4 horas de incubación. En estas condiciones, la media ponderada de los resultados obtenidos en 4 experimentos independientes reveló que mientras la cepa silvestre mostró un valor de A de $0,73 \pm 0,09$, la capacidad de adsorción del mutante fue unas 14 veces inferior, obteniéndose un valor de $0,05 \pm 0,02$.

Los ensayos de colonización se realizaron básicamente como los ensayos de adsorción con la salvedad de que se partió de una suspensión bacteriana diez veces más concentrada que la utilizada en los ensayos de adsorción. Tras el periodo de incubación y los lavados correspondientes, las plántulas con las bacterias que quedaran íntimamente adheridas a sus raíces, se colocaron en solución nutritiva y se mantuvieron en fitotrón. La capacidad de las bacterias de proliferar en la superficie de la raíz (colonización), se determinó 2, 24 y 48 horas después de iniciar la incubación en la cámara de plantas. Tal y como era esperable de acuerdo con los datos obtenidos en adsorción, aunque el número inicial de bacterias presentes en la solución nutritiva era el mismo ($2,52 \times 10^5$ cfu/ml para 1021 y $2,42 \times 10^5$ cfu/ml para 1021pgi), el número de células de 1021 liberadas de las raíces de alfalfa transcurridas 2 horas de incubación fue significativamente superior (unas 4,8 veces) al obtenido para el mutante (Fig. R.I.28). Esta diferencia se hizo especialmente llamativa 24 horas después de iniciar la incubación donde el número de bacterias de la cepa silvestre que consiguió proliferar a expensas de los exudados de la raíz fue más de 20 veces superior al obtenido para la cepa mutante. Esta diferencia en el tamaño de población bacteriana asociada a la raíz de cepas silvestre y mutante parece sin embargo reducirse con el tiempo, ya que a las 48 horas, aunque el número de bacterias 1021pgi asociadas a la raíz sigue siendo inferior, las diferencias ya no son estadísticamente significativas. Estos datos sugieren que el defecto simbiótico observado en 1021pgi podría ser consecuencia del defecto en adsorción y colonización mostrado por esta cepa.

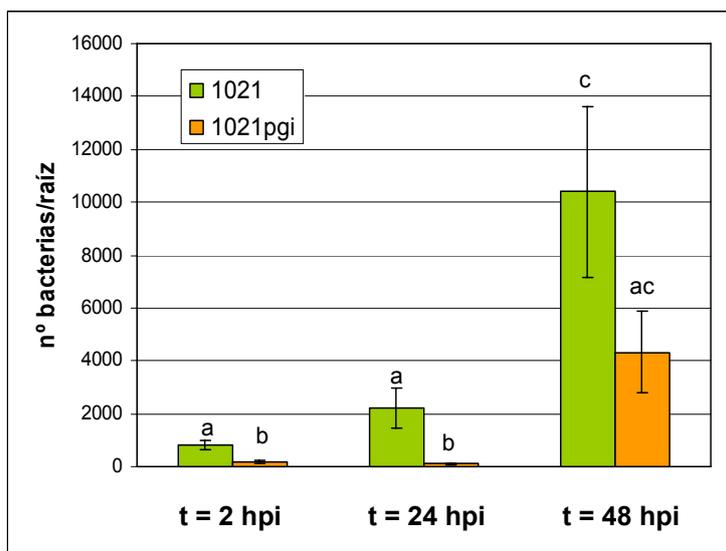


Figura R.I.28. Colonización de raíces de alfalfa por las cepas 1021 y 1021pgi de *S. meliloti* a distintos tiempos de incubación (hpi). Los valores corresponden a la media y error estándar de bacterias liberadas de un total de 15 plántulas en un único ensayo. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

4.4. Estudios *in vitro*

4.4.1 Purificación de la proteína codificada por SMC02163

Con el fin de caracterizar a nivel bioquímico la proteína codificada por el gen SMC02163, así como para poder obtener anticuerpos específicos anti-SMC02163, se procedió a la sobre-expresión y purificación de la proteína recombinante en *E. coli*, utilizando el sistema comercial IMPACT™ – CN (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) (New England BioLabs®). En este sistema, la proteína objeto de estudio se fusiona a inteína, una proteína de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene actividad inducible de auto-corte y a la que se le ha introducido un dominio de unión a quitina que permite la purificación por cromatografía de afinidad en una columna de quitina (Fig. R.I.29). La adición de tioles, induce la actividad de auto-corte específico de la inteína, liberando la proteína de interés del resto de la construcción que queda ligada a la columna de quitina. En este sistema se usan vectores pTYB en los que la expresión del gen está dirigida por un promotor T7 (reconocido específicamente por la ARN polimerasa del fago T7) y que contienen una copia del gen *lacI* que codifica el represor lac. La unión del represor al operador *lac* del promotor T7 impide la expresión del gen de interés en ausencia de inducción por IPTG.

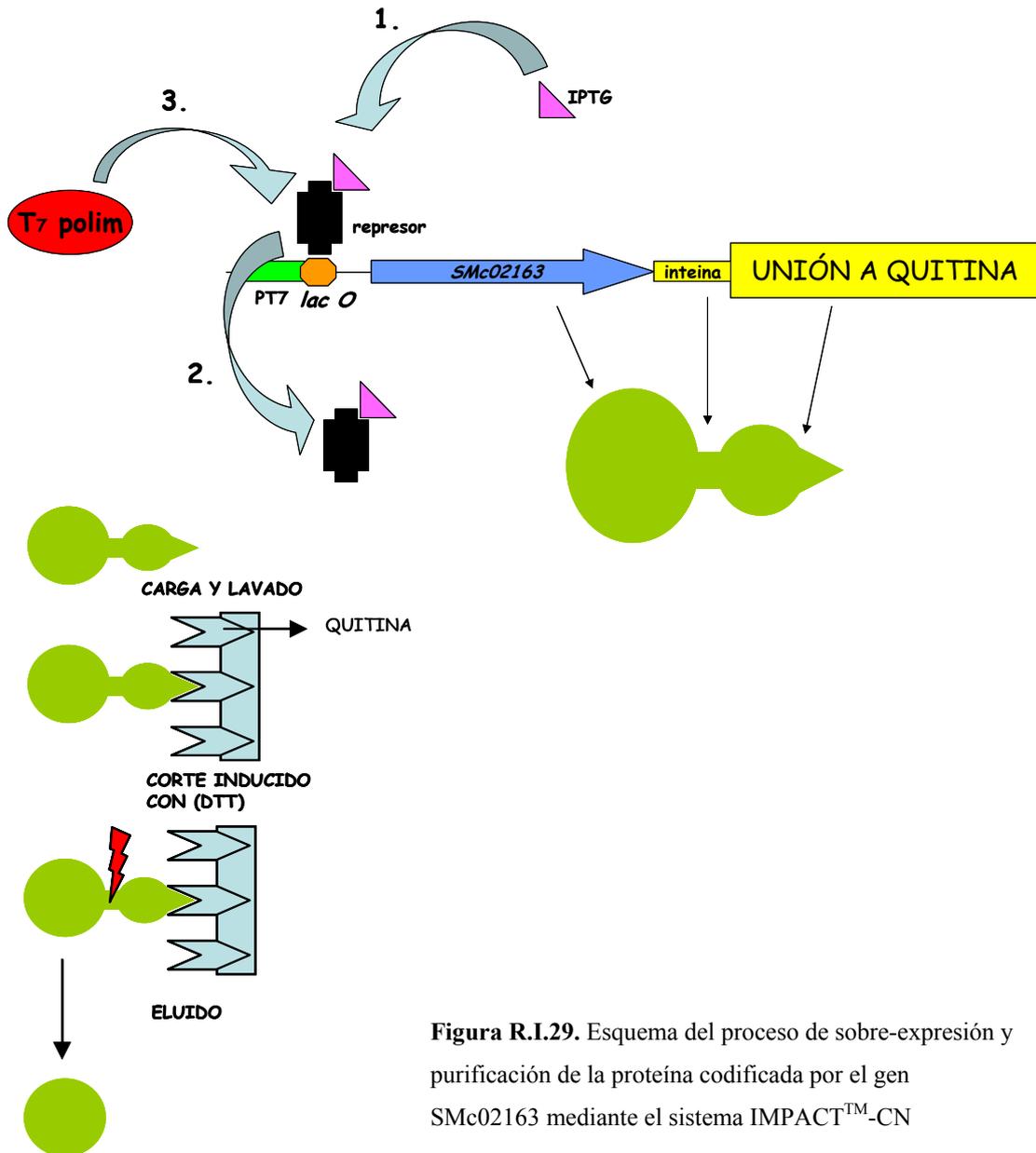


Figura R.I.29. Esquema del proceso de sobre-expresión y purificación de la proteína codificada por el gen SMc02163 mediante el sistema IMPACT™-CN

Para la sobre-expresión del gen SMc02163 de *S. meliloti* 1021, se obtuvo la construcción pTYB2-*pgi* (ver Anexo I.3) en la que el gen de estudio se clonó en el vector pTYB2. El resultado es una fusión C-terminal en la que el extremo carboxilo de la proteína codificada por SMc02163 se fusiona a la inteína. La estrategia de clonaje en este vector añade un residuo extra de glicina al C-terminal de la proteína SMc02163. La construcción fue comprobada mediante secuenciación usando cebadores específicos del vector confirmándose que la fusión originada era correcta. El plásmido pTYB2-*pgi* se introdujo en la cepa ER2566 de *E. coli* que contiene una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa del fago T7 insertada en el gen *lacZ*, y por tanto bajo el control del

Capítulo I. RESULTADOS

promotor *lac*. Se seleccionaron varios transformantes ER2566 (pTYB2-*pgi*) y se analizó la expresión de la proteína recombinante mediante electroforesis en geles SDS-PAGE, tras inducción con distintas concentraciones de IPTG (Fig. R.I.30).

La proteína de fusión, con un tamaño aproximado de 113 KDa (58 KDa correspondientes a la proteína codificada por SMc02163 + 55 KDa correspondientes a la inteína) se observó en distintos clones tras la inducción con IPTG, mayoritariamente en los extractos clarificados, indicando que la proteína sobre-expresada se encontraba en la bacteria en forma soluble. Los mejores resultados se consiguieron con el clon 2 crecido en medio LB a 37 °C hasta $DO_{600} = 0,6 - 0,7$ y posterior inducción con 0,3 mM IPTG durante 16 horas a 18 °C (Fig. R.I.30).

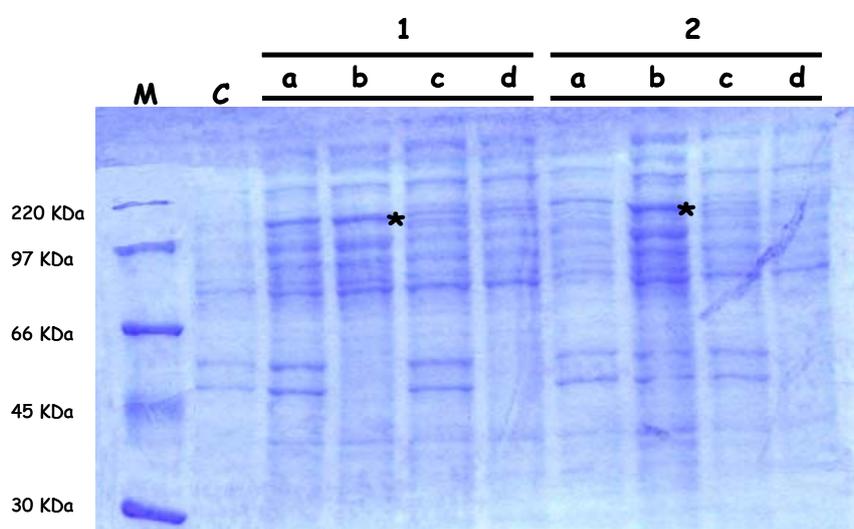


Figura R.I.30. Expresión de la proteína de fusión de pTYB2-*pgi* en la cepa ER2566 de *E. coli*. Carriles: **M.** Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad®); **C.** extracto crudo de ER2566 (pTYB2-*pgi*) sin inducir con IPTG; **1,2.** dos clones distintos de ER2566 conteniendo la construcción pTYB2-*pgi*; **a.** extracto crudo obtenido tras inducción con IPTG 0,3 mM; **b.** extracto a clarificado; **c.** extracto crudo obtenido tras inducción con IPTG 1 mM; **d.** extracto c clarificado.* proteína de fusión.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de sobre-expresión, se procedió a la purificación de SMc02163 partiendo de 2 litros de cultivo y llevando a cabo cromatografía de afinidad y FPLC tal y como se describe en Material y Métodos. Las fracciones recogidas tras FPLC que contenían la proteína se combinaron y concentraron mediante ultrafiltración. Una alícuota de la muestra concentrada se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE (Fig. R.I.31), observándose un grado de purificación y rendimiento suficientes como para poder abordar el estudio *in vitro* de la

actividad enzimática de SMc02163. La determinación de la concentración de proteína reveló que el rendimiento del proceso fue de 3,5 mg de proteína por litro de cultivo.

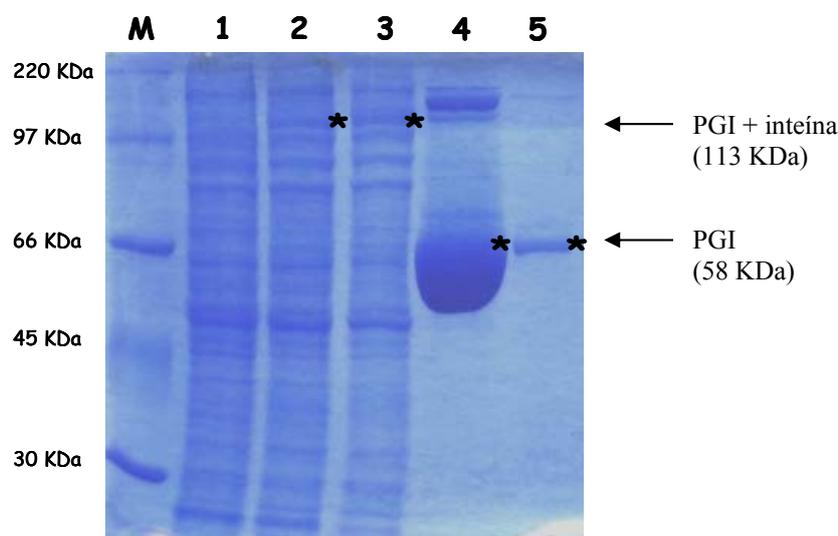


Figura R.I.31. Purificación de la proteína SMc02163. Carriles. **M.** Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad®); **1.** extracto crudo de ER2566 (pTYB2-*pgi*) sin inducir; **2.** extracto crudo de ER2566 (pTYB2-*pgi*) tras inducción con 0,3 mM de IPTG; **3.** extracto crudo clarificado de ER2566 (pTYB2-*pgi*) tras inducción con 0,3 mM de IPTG; **4.** alícuota de muestra dializada tras cromatografía de afinidad; **5.** muestra purificada tras FPLC

4.4.2 Caracterización bioquímica de la proteína SMc02163

La proteína SMc02163 purificada fue capaz de catalizar la conversión de fructosa-6-P en glucosa-6-P, confirmándose que el proceso de purificación no había afectado a la actividad PGI. Decidimos llevar a cabo la determinación de algunas de sus propiedades catalíticas así como de su estado oligomérico, y comparar los datos obtenidos con los de otras proteínas PGI.

Las propiedades catalíticas se determinaron siempre para la reacción de conversión de fructosa-6-P en glucosa-6-P. La actividad PGI presentó un comportamiento típico de enzimas con cinética de Michaelis-Menten (Fig. R.I.32). A concentraciones de sustrato fijas la aparición de producto fue proporcional a la cantidad de enzima administrada (Fig. R.I.32A). A medida que avanzó el tiempo de reacción, la actividad enzimática disminuyó de forma hiperbólica por acúmulo de producto y el descenso en la concentración de sustrato existente (Fig. R.I.32B).

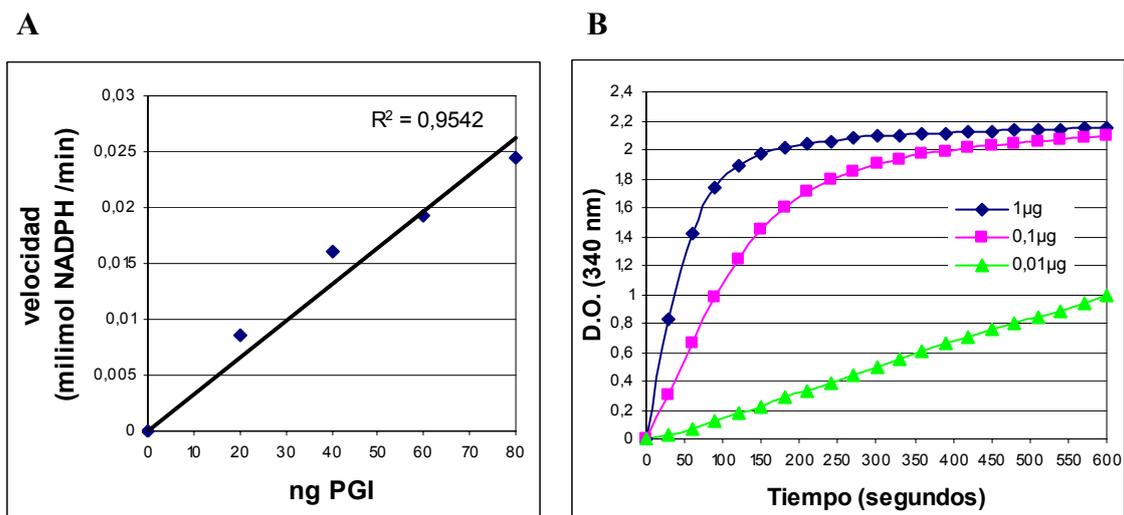


Figura R.I.32. Propiedades enzimáticas de la actividad PGI de SMc02163. **A)** Relación lineal entre la velocidad enzimática PGI y la concentración de enzima utilizada. **B)** Actividad PGI a lo largo del tiempo asociada con diferentes cantidades de proteína PGI de *S. meliloti* purificada.

Hemos determinado la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), la constante de Michaelis (K_m), así como el valor de la eficiencia catalítica de la actividad PGI de SMc02163 (Figura R.I.33). El valor obtenido en eficiencia catalítica para SMc02163 se encontró en el orden del conocido para otras PGI convencionales, siendo algo superior a la mostrada por la actividad de *E. coli* y 3 veces inferior a la PGI humana. Por el contrario, la eficiencia catalítica de la actividad PGI de SMc02163 superó en más de 3 órdenes de magnitud el obtenido para la cPGI de *S. meliloti* codificada por SMc02042 (Tabla R.I.2).

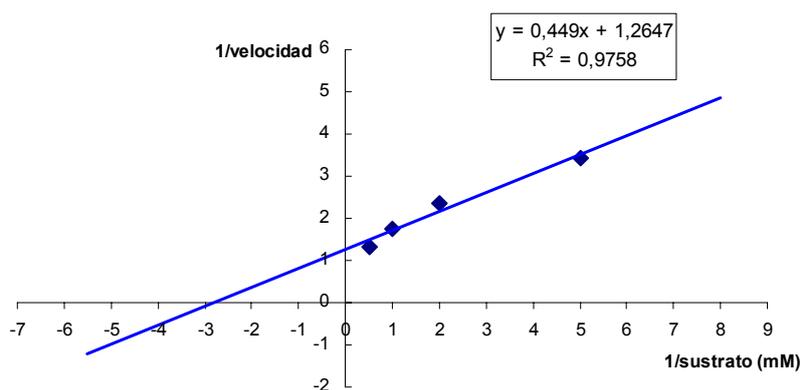


Figura R.I.33. Determinación de los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la proteína SMc02163 mediante diagrama de Lineweaver-Burk. Se muestra encuadrada la ecuación de la recta de regresión de los valores obtenidos y el coeficiente de correlación de la línea de tendencia R^2 .

Tabla R.I.2. Comparación de parámetros cinéticos de distintas proteínas con actividad PGI

Proteína (organismo)	V _{máx} (μmol/min x mg)	K _m (mM)	V _{máx} / K _m	K _i (mM)	Referencia
P0A6T1 (<i>E. coli</i>)	316,7	0,2	1584	0,19	(Dykhuizen & Hartl, 1983; Schreyer & Bock, 1980)
NP_000166 (<i>Homo sapiens</i>)	445	0,063	7064	0,073	(Kanno <i>et al.</i> , 1998; Tilley <i>et al.</i> , 1974)
AAF35988 (conejo)	1037	0,174	5960	0,15	(Dyson & Noltmann, 1968)
SMc02042 (<i>S. meliloti</i> cPGI)	0,3	0,8	0,38	ND	(Hansen <i>et al.</i> , 2005)
SMc02163 (<i>S. meliloti</i>)	790	0,368	2257	0,15	Este trabajo

Se sabe que la actividad de PGIs convencionales se inhibe por una serie de compuestos capaces de unirse o bloquear el centro activo de la enzima (Howell & Schray, 1981; Milewski *et al.*, 2006). Entre dichos inhibidores se encuentran derivados monosacáridicos fosforilados tales como el 6-fosfogluconato, 5-fosfo-D-arabinonato, sorbitol-4-fosfato, fructosa-1-fosfato, manosa-6-fosfato y eritrosa-4-fosfato. En este trabajo se ha determinado el efecto potencialmente inhibidor del 6-fosfogluconato sobre la actividad PGI de SMc02163. Como se muestra en la Figura R.I.34, este compuesto tuvo un efecto significativo de inhibición competitiva sobre la actividad enzimática de la proteína determinándose un valor de K_i de 0,15 mM, idéntico al descrito para la PGI de conejo.

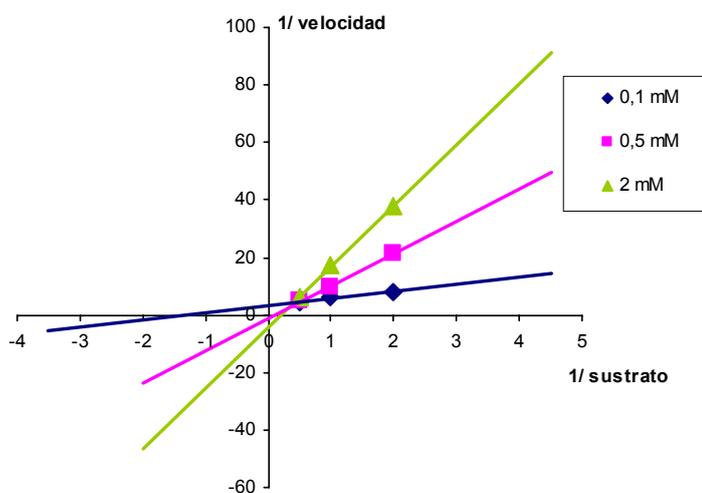


Figura R.I.34. Determinación de la constante K_i de la proteína SMc02163 mediante diagrama a distintas concentraciones de inhibidor (6-fosfogluconato).

El análisis mediante electroforesis en geles desnaturalizantes SDS-PAGE reveló que la forma monomérica de SMc02163 tiene un peso molecular aparente de 58,4 KDa (Fig. R.I.31) muy similar al valor estimado en los análisis *in silico* (58,61 KDa). Numerosas proteínas con actividad PGI suelen encontrarse formando dímeros (Read *et al.*, 2001). Para determinar el estado oligomérico de SMc02163 se llevó a cabo una electroforesis en condiciones nativas utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como marcador. Como se aprecia en la Figura R.I.35, la proteína migró como una banda con una masa molecular estimada cercana a los 117 KDa, sugiriendo una estructura homodimérica. Este tipo de estructuras en homodímero se corresponden con la única forma funcional en proteínas PGI convencionales (Read *et al.*, 2001).

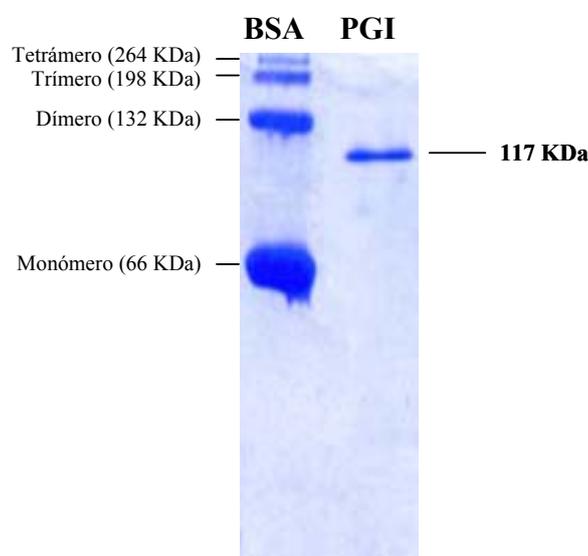


Figura R.I.35. Separación electroforética de albúmina sérica bovina (BSA) y SMc02163 purificada en gel de acrilamida-bisacrilamida (10%) desarrollado en condiciones nativas.

4.4.3. Actividad citoquina AMF (factor autocrino de motilidad) de la proteína SMc02163 en células tumorales

PGI es un ejemplo de proteína “moonlighting”, es decir, una proteína capaz de desempeñar varias funciones, aparentemente no relacionadas (Tompa *et al.*, 2005). En humanos, cuando se encuentra dentro de la célula, PGI participa en glucólisis y gluconeogénesis catalizando la isomerización reversible entre glucosa-6-P y fructosa-6-P. En cambio, cuando su localización es extracelular funciona como una citoquina, una proteína que participa en comunicación intercelular regulando diversas funciones tras la activación de receptores específicos de membrana. Así, se ha descrito que PGI tiene

actividad AMF (autocrine motility factor), neuroleuquina y de factor de maduración (Haga *et al.*, 2000). AMF es una citoquina secretada exclusivamente por células tumorales capaz de afectar la capacidad de migración, invasión, proliferación y supervivencia de las células, por lo que es un factor clave en el progreso de tumores y desarrollo de metástasis (Funasaka & Raz, 2007). PGI no muestra péptido señal para su secreción la cual, aunque aún no bien entendida, tiene lugar a través de rutas “no-clásicas” estimuladas por la sobre-expresión de la proteína. Para que PGI muestre actividad AMF, la proteína ha de interactuar con un receptor presente en la superficie de ciertas células, el AMFR, una glicoproteína que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (revisado en Funasaka & Raz, 2007). Inhibidores de la actividad enzimática de PGI también inhiben su actividad citoquina, aunque la actividad isomerasa no se requiere en la función de citoquina (Tsutsumi *et al.*, 2003). Se ha sugerido que para ejercer su acción, el bolsillo de reconocimiento del sustrato de AMF (aas 117-288) ha de reconocer la cadena azucarada de AMFR, para que posteriormente el extremo C-terminal de la citoquina interactúe con la fracción proteica del receptor (Haga *et al.*, 2006).

Se ha descrito que la PGI de *B. stearothermophilus*, cuya estructura cristalina se conoce, es capaz de estimular la motilidad de células cancerígenas de colon (CT-26) de ratón (Sun *et al.*, 1999), pero no la motilidad de fibroblastos NIH-3T3, lo que ha llevado a proponer que o bien existen distintos receptores para PGI, o que la función citoquina quizás sea específica de PGI de mamíferos (Amraei & Nabi, 2002). Aunque el centro activo del homodímero funcional de *Bacillus* está muy conservado con el del enzima de mamíferos, la secuencia de aminoácidos de la proteína bacteriana sólo muestra un 16,9% de identidad con la proteína humana, y de hecho ambas proteínas pertenecen a distintas subfamilias (ver Fig. R.I.8).

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína SMc02163 de *S. meliloti* muestra mayor identidad con la PGI humana (51%). Decidimos comprobar si esta proteína presentaba actividad citoquina AMF, en una colaboración con el grupo del doctor Avraham Raz (Wayne State University, Detroit, USA). Concretamente, se ensayó la capacidad de la proteína de *S. meliloti* de promover la capacidad invasiva de células de fibrosarcoma humano HT-1080. Como se puede apreciar en la Fig. R.I.36 la presencia de la proteína de *S. meliloti* incrementó significativamente el número de células tumorales que invadieron el compartimento inferior del sistema, alcanzando niveles muy similares a los obtenidos para AMF de humano. Estos resultados

demuestran que la proteína SMc02163 muestra actividad citoquina incrementando la capacidad de invasión de células tumorales HT-1080.

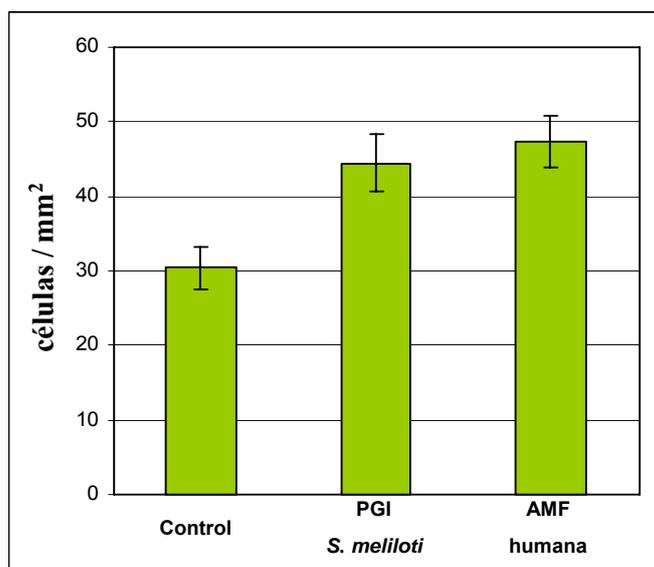


Figura R.I.36. Actividad citoquina AMF asociada a SMc02163 de *S. meliloti*

4.5. Análisis de expresión del gen SMc02163

Una última aproximación abordada durante la caracterización funcional del gen SMc02163 de *S. meliloti*, consistió en analizar su patrón de expresión, aspecto del que existen dos referencias en la literatura. En un estudio en el que se comparó el transcriptoma de *S. meliloti* 1021 en condiciones de vida libre y en simbiosis, se puso de manifiesto que el gen anotado como *pgi* (SMc02163), al igual que otros genes que codifican enzimas de la ruta glucolítica, se encontraban reprimidos en el bacteroide (Becker *et al.*, 2004). Este resultado se consideró lógico ya que la principal fuente de carbono de la forma endosimbiótica de la bacteria son los ácidos dicarboxílicos. En otro estudio transcriptómico en el que se identificaron genes de *S. meliloti* que responden a estrés hiperosmótico, SMc02163 apareció reprimido en células sometidas a un incremento súbito de la osmolaridad del medio, aunque su expresión no se modificó en células que crecieron en condiciones hiperosmóticas desde un inicio (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006).

Con objeto de corroborar estas observaciones y obtener información sobre las posibles condiciones en las que la participación del gen *pgi* pueda ser importante, en este trabajo hemos abordado el análisis de expresión del gen SMc02163 tanto en condiciones de vida libre como en simbiosis con plantas de alfalfa. Para ello hemos hecho uso de una fusión transcripcional *pgi::lacZ* (pMPPGI) cuya construcción se

detalla en el Anexo I.4. En determinados casos, la expresión se confirmó analizando los niveles de proteína mediante Western blot, para lo cual se utilizaron anticuerpos específicos anti-SMc02163.

4.5.1 Obtención y especificidad de anticuerpos policlonales anti-SMc02163

Tras obtener los sueros de conejos inmunizados frente a la proteína recombinante, los anticuerpos policlonales generados frente a SMc02163 se purificaron por afinidad tal y como se describe en el apartado 3.22 de Materiales y Métodos. Para comprobar la especificidad de estos anticuerpos, se llevaron a cabo análisis por Western blot de extractos totales de células de *S. meliloti* 1021, mutante 1021pgi y 1021pgi (pPGI500) crecidas en medio TY líquido, así como de extractos de nódulos de alfalfa inducidos por estas mismas bacterias. Como se puede observar en la Figura R.I.37, sólo se pudo detectar una banda del tamaño esperado para la subunidad de PGI, en los carriles correspondientes a los extractos celulares de 1021 y 1021pgi (pPGI500) (Fig. R.I.37A), o de nódulos inducidos por estas bacterias (Fig. R.I.37B).

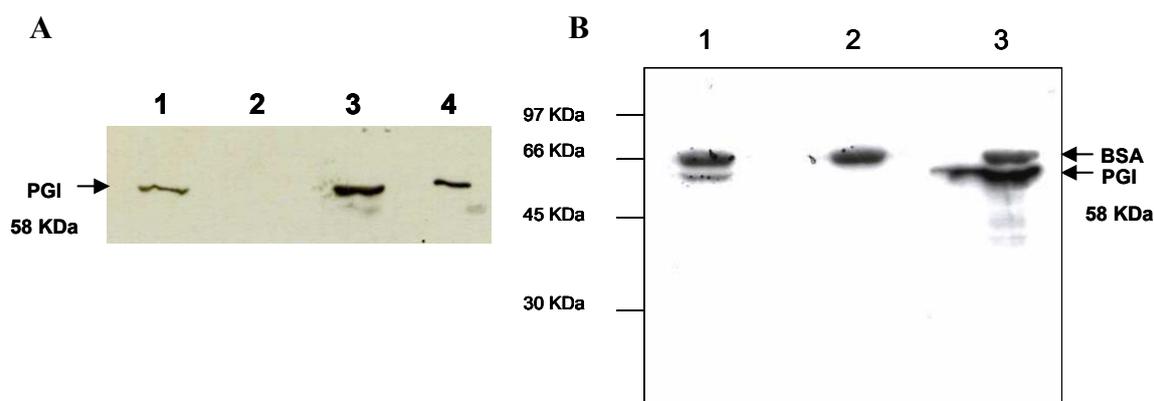


Figura R.I.37. Inmunodetección de proteína SMc02163 en distintas condiciones experimentales. (A) Extractos totales de células de *S. meliloti* crecidas en TY líquido. (B) Extractos de nódulos de alfalfa (26 dpi) inducidos por distintas cepas de *S. meliloti* Carriles: 1. 1021; 2. 1021pgi ; 3. 1021pgi (pPGI500); 4. SMc02163 purificada, 10 ng.

Como además era de esperar por la sobre-expresión del gen *pgi* causada por la presencia de la construcción pPGI500, la intensidad de la banda fue mayor en el mutante complementado que en la cepa silvestre. La ausencia de bandas adicionales en 1021 y la ausencia total de señal asociada a los extractos del mutante 1021pgi, confirman la especificidad de los anticuerpos obtenidos frente a la proteína SMc02163,

y la ausencia de reacción cruzada con las cPGI que se sabe se expresan en *S. meliloti* en las condiciones experimentales utilizadas (Hansen *et al.*, 2005). Además, el ensayo realizado con extractos de nódulos revela que los anticuerpos no reconocen PGIs de origen vegetal, por lo que podrían ser usados en experimentos posteriores de inmunolocalización “*in planta*”.

4.5.2. Análisis de expresión del gen *pgi* en condiciones de vida libre

Se ha estudiado la influencia de diversos factores en la expresión del gen *pgi* en vida libre: medio de crecimiento, inductores de genes *nod*, estrés osmótico y fase de crecimiento bacteriano.

Para determinar la influencia del medio de crecimiento, se analizó la actividad β -galactosidasa presente en cultivos en fase logarítmica (DO_{600} : 0,1-0,7) de *S. meliloti* GR4 que contenían la fusión transcripcional pMPPGI, tras crecimiento en distintos medios. Como control, se llevaron en paralelo cultivos que contenían la construcción pGD499 en la que el gen reportero *lacZ* se encuentra bajo el control del promotor del gen de resistencia a kanamicina, de expresión constitutiva. Como se puede apreciar en la Tabla R.I.3, los valores de expresión tanto de la fusión control como de la fusión SMc02163::*lacZ* fueron similares entre los distintos medios. No obstante, el mayor valor de expresión de *pgi* se obtuvo en medio rico TY, y el menor en medio mínimo con fructosa como fuente de carbono. Es interesante remarcar que la utilización como fuente de carbono de un ácido dicarboxílico como el succinato, en cuya degradación no es necesaria la participación de PGI, no conllevó una disminución en la expresión del gen con respecto al valor observado en células que utilizaron fructosa, una fuente carbonada que sí requiere PGI para su catabolismo. Además hemos comprobado que la adición a TY o MM (NO_3K + Glucosa) de glucosa-6 fosfato o fructosa-6-fosfato (sustratos del enzima) a concentraciones de 0,5 %, no indujeron cambios significativos en la expresión del gen (datos no mostrados).

Tabla R.I.3. Influencia del medio de crecimiento en la expresión del gen SMc02163 de *S. meliloti*

	Activ. β -galactosidasa (U Miller) ^a	
	pMPPGI (SMc02163:: <i>lacZ</i>)	pGD499 (<i>npt</i> :: <i>lacZ</i>)
TY	1290 \pm 70 (a)	355 \pm 23 (a)
MM (NO₃K + Glucosa)	1060 \pm 82 (ab)	340 \pm 20 (a)
MM (NO₃K + Fructosa)	865 \pm 41 (b)	NA
MM (NO₃K + Succinato)	1019 \pm 53 (b)	NA
MM (Glutam. + Manitol)	1014 \pm 72 (b)	376 \pm 6 (a)

^a Los valores corresponden a la media y error estándar de entre 3 y 10 determinaciones. NA, no analizado. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($p \leq 0,05$)

La adición de luteolina (5 μ M), inductor de genes *nod* de *S. meliloti*, a cultivos de GR4 (pMPPGI) crecidos en medio mínimo (manitol + glutamato), no tuvo ninguna influencia en la expresión del gen SMc02163, obteniéndose valores de 731 \pm 42, y 720 \pm 46, en ausencia y presencia del flavonoide, respectivamente.

Dado que SMc02163 parece participar en la osmoadaptación de *S. meliloti* a altas concentraciones de NaCl (ver apartado 4.3.5 de este capítulo), y en un estudio transcriptómico se observó represión de *pgi* tras un choque osmótico con NaCl o sacarosa (4 veces menos expresión que en las condiciones control) (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006), decidimos estudiar la influencia de un estrés osmótico en la expresión de este gen. En un primer experimento, se intentó corroborar los datos obtenidos por Domínguez-Ferreras y colaboradores (2006), analizando la expresión del gen en 1021 en respuesta a un incremento súbito de la osmolaridad del medio. Para ello, el cultivo se creció en medio mínimo (manitol + glutamato) hasta una DO_{600nm} de 0,5, momento en el que se adicionó NaCl hasta una concentración final de 300 mM. En paralelo se llevó un cultivo control en el que se añadió una cantidad equivalente de medio fresco. La actividad β -galactosidasa se determinó 1, 3 y 5 horas después de aplicar el choque osmótico. Como se puede apreciar en la Figura R.I.38, aunque transcurridas 1 y 5 horas tras el choque se apreció una disminución en la expresión del gen SMc02163 con respecto al cultivo control, ésta fue muy pequeña y nunca llegó a los

niveles observados en el estudio transcriptómico de Domínguez-Ferreras y colaboradores (2006), diferencias que pueden ser atribuidas a las distintas técnicas empleadas (microarrays o fusión transcripcional en plásmido).

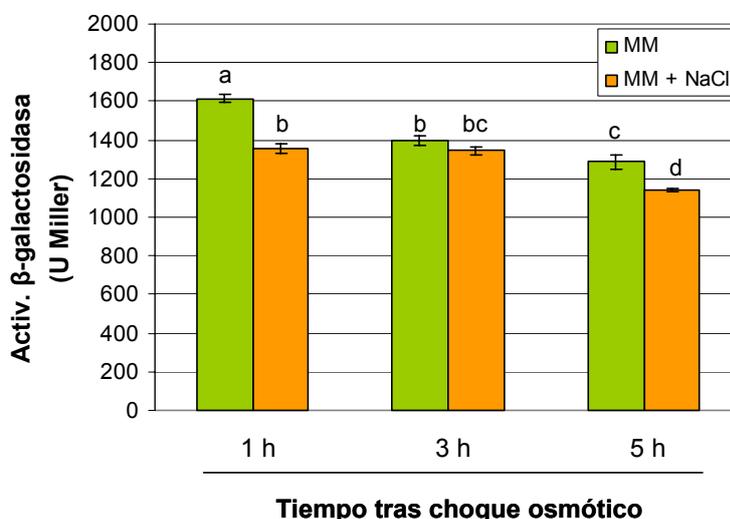


Figura R.I.38. Expresión de la fusión transcripcional SMc02163::*lacZ* en *S. meliloti* 1021 en respuesta a un incremento súbito de la osmolaridad del medio con 300 mM de NaCl. Los datos representan la media y error estándar de 3 determinaciones. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA ($P \leq 0,05$).

En una segunda aproximación, decidimos estudiar el efecto de la presencia continuada del NaCl sobre la expresión del gen *pgi*. En este caso, el análisis se realizó tanto en células de GR4 como 1021 crecidas en medio mínimo (manitol + glutamato), en presencia/ausencia de 300 mM de NaCl y en distintas fases de crecimiento (logarítmica temprana DO = 0,1 – 0,2 , logarítmica media DO = 0,4 – 0,5 y estacionaria DO = 1,5 – 1,7). Se analizó la actividad β -galactosidasa de cultivos que contenían la fusión SMc02163::*lacZ* (Fig. R.I.39A), y en paralelo la de cultivos conteniendo la fusión control *npt*::*lacZ* (Fig. R.I.39B). Los resultados obtenidos fueron muy similares para las dos cepas de *S. meliloti* pudiéndose destacar tres hechos relevantes:

1.- Tanto en ausencia como en presencia de la sal, existe una represión del gen SMc02163 en fase estacionaria, disminuyendo los niveles de expresión entre 1,6 y 4 veces con respecto a los valores obtenidos en fase logarítmica.

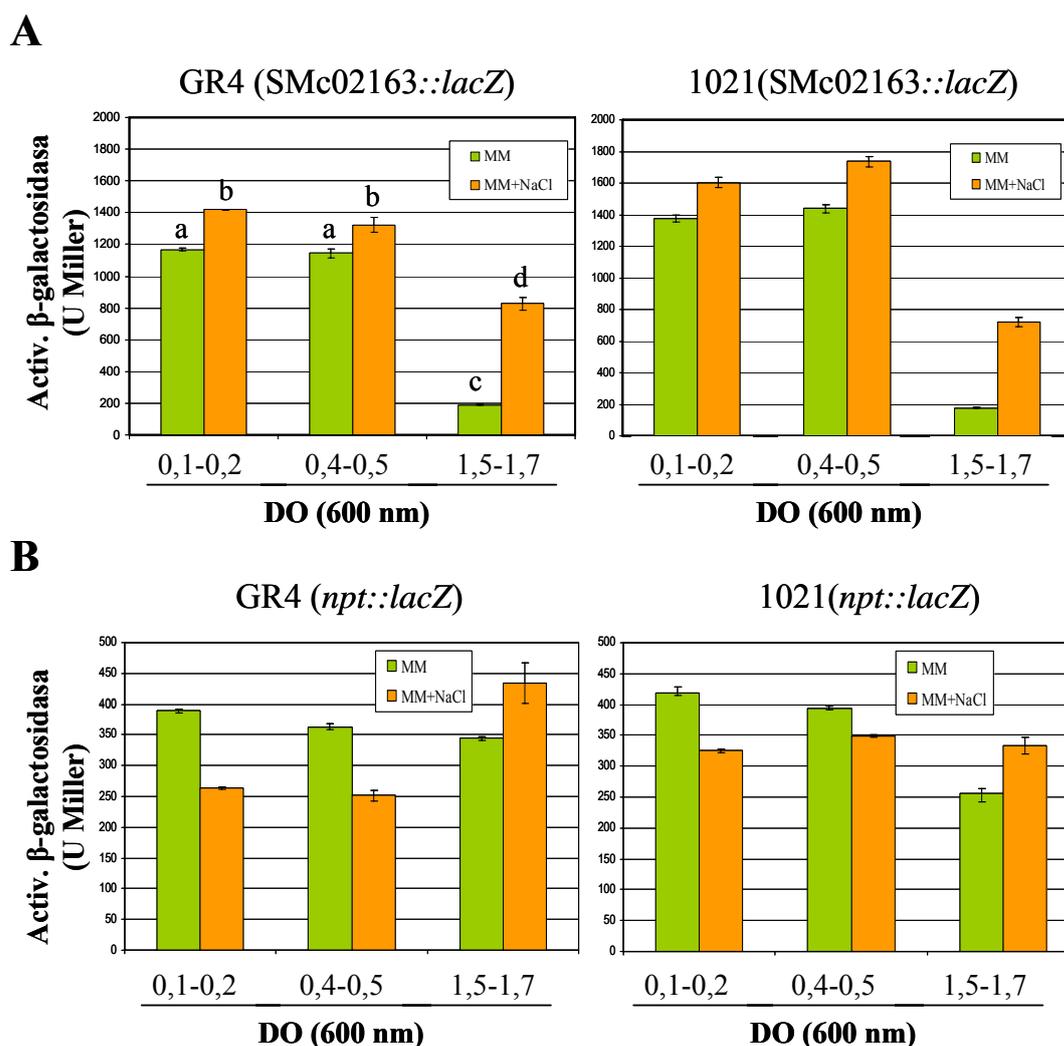


Figura R.I.39. Efecto en la expresión de SMc02163 de *S. meliloti* a la presencia de 300 mM de NaCl y la fase de crecimiento del cultivo. Actividad β -galactosidasa de cultivos de GR4 y 1021 conteniendo la fusión transcripcional SMc02163::*lacZ* (A) o la fusión control *npt*::*lacZ* (B). Los datos representan la media y error estándar de 3 determinaciones. Letras distintas indican diferencias significativas según un test de ANOVA.

2.- En las tres fases de crecimiento analizadas, la expresión de SMc02163 fue superior cuando la bacteria creció en presencia de 300 mM de NaCl, hecho que fue especialmente llamativo en fase estacionaria ($DO_{600\text{ nm}} : 1,5-1,7$), incrementándose 4,4 veces (GR4) y 4 veces (1021) con respecto a los niveles en condiciones no estresantes. Este hecho puede ser consecuencia de la tercera observación.

3.- La represión de SMc02163 en fase estacionaria es menor cuando la bacteria se encuentra sometida a estrés salino, disminuyendo los niveles de expresión sólo 1,6 (GR4) ó 2,4 (1021) veces, con respecto a los valores en fase logarítmica.

Con objeto de definir de manera más exacta el efecto de la fase de crecimiento y el estrés hiperosmótico en la expresión de *pgi*, se analizó la actividad β -galactosidasa presente en células de 1021 (pMPPGI) en distintos puntos de la curva de crecimiento en medio mínimo (manitol + glutamato), en presencia/ausencia de 300 mM de NaCl (Fig. R.I.40A). Además, para corroborar si el efecto observado en transcripción se correlacionaba con los niveles totales de proteína, algunos de los puntos de estos mismos cultivos se sometieron a un análisis por Western blot (Fig. R.I.40B). Los resultados obtenidos confirman que tanto los niveles de transcripción como los de proteína PGI se reducen sensiblemente en fase estacionaria en presencia y ausencia de NaCl. No obstante, la presencia de condiciones hiperosmóticas incrementa los niveles de expresión del gen y retrasan la represión del mismo en fase estacionaria.

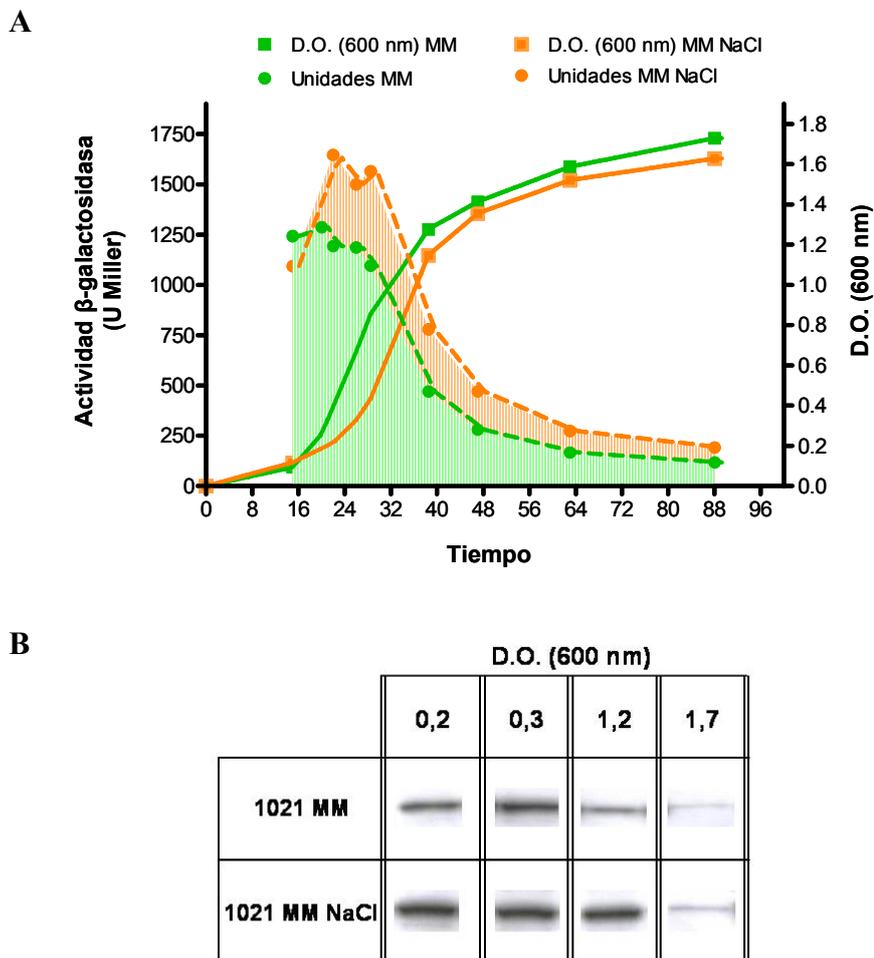


Figura R.I.40. Efecto de la fase de crecimiento y de un estrés hipersalino en la expresión de *pgi* de *S. meliloti* 1021. **A)** Curva de crecimiento (cuadrados y línea continua) y actividad β -galactosidasa (círculos y línea discontinua) de *S. meliloti* 1021 conteniendo la fusión SMc02163::*lacZ* en medio mínimo adicionado (naranja) o no (verde) de 300 mM de NaCl. **B)** Análisis por Western blot de los niveles de PGI presentes en cultivos de 1021 tomados a distintas DO.

Además, hemos comprobado que la represión de *pgi* en fase estacionaria no es exclusiva de células crecidas en MM (manitol + glutamato), observándose también represión del gen en MM (NO₃K + glucosa) y en MM (NO₃K + succinato) (Fig. R.I.41).

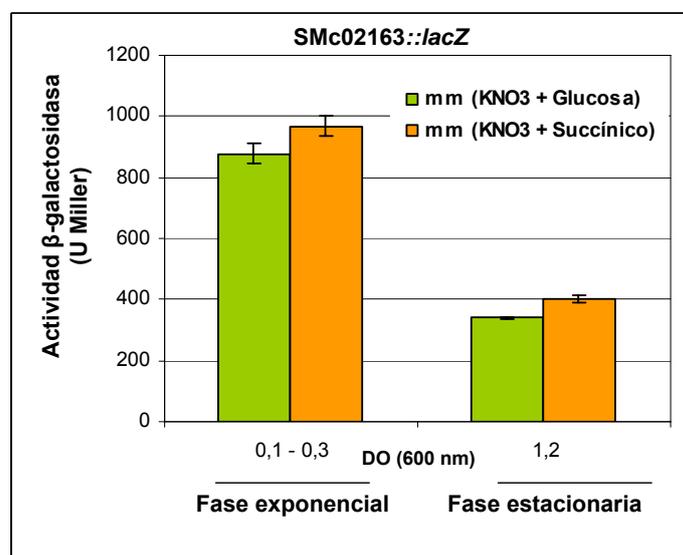


Figura R.I.41. Expresión de la fusión SMc02163::lacZ en cultivos de *S. meliloti* 1021 en fase exponencial y estacionaria de crecimiento en medio mínimo con KNO₃ como única fuente de nitrógeno y glucosa o succínico como fuentes de carbono.

4.5.3. Análisis de expresión del gen SMc02163 en condiciones simbióticas

Para analizar la expresión del gen *pgi* en simbiosis, se llevó a cabo la detección histoquímica de actividad β -galactosidasa en secciones de nódulos de 10, 20 y 30 días, obtenidos tras inocular plantas de alfalfa con un cultivo de *S. meliloti* 1021 conteniendo la fusión transcripcional SMc02163::lacZ. Como control positivo de la detección, se utilizaron nódulos de alfalfa inducidos por 1021 conteniendo la fusión *npt*::lacZ de expresión constitutiva. Además, y aunque se llevó a cabo un protocolo adaptado para minimizar la posible tinción resultante de la actividad β -galactosidasa vegetal, se llevó en paralelo el estudio de nódulos inducidos por 1021 (pMP220), vector donde el gen *lacZ* carece de promotor. En la Fig. R.I.42, se muestran los resultados obtenidos en nódulos de 10 y 20 días. El estudio en nódulos de 30 días fue descartado al detectarse coloración azul en los nódulos inducidos por 1021 (pMP220).

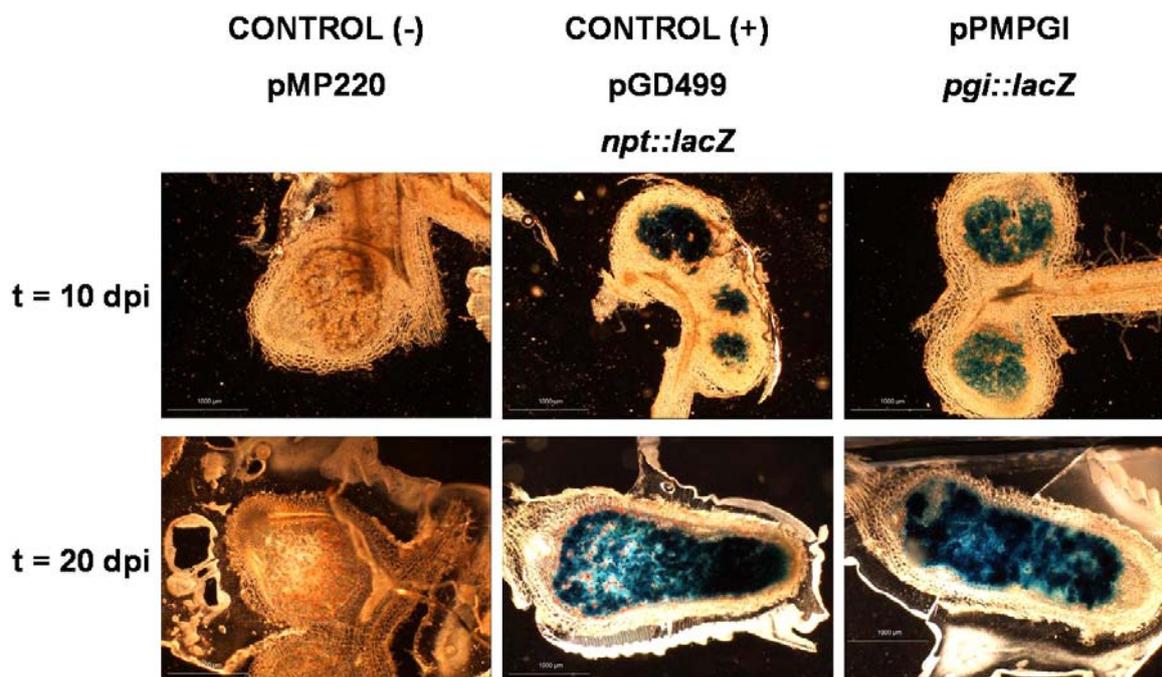


Figura R.I.42. Localización histoquímica de la actividad β -galactosidasa en nódulos de alfalfa inducidos por cepas de *S. meliloti* 1021 conteniendo distintas construcciones.

Transcurridos 10 días después de la inoculación, los nódulos inducidos por 1021 (pGD499) y 1021 (pMPPGI) mostraron coloración azul en la parte central donde se hallan las células vegetales infectadas, mientras que los tejidos periféricos aparecieron sin teñir. En el caso de los nódulos inducidos por 1021 (pMPPGI), la tinción de la zona central parecía ser algo menos intensa que en los inducidos por la cepa que contiene el gen *lacZ* bajo el control del promotor de la kanamicina. En nódulos de 20 días inducidos por 1021 (pMPPGI), llamó la atención el hecho de que la tinción no se detectó en la parte apical del nódulo, en lo que podría corresponder a las zonas I y II, mientras que en los nódulos inducidos por 1021 (pGD499) la coloración azul se observó a lo largo de todo el nódulo. Puesto que no hemos realizado una tinción con I₂-KI para detectar amiloplastos típicos de la interzona II-III, no podemos corroborar a partir de qué zona se inicia la expresión de SMc02163 en el nódulo. Estos resultados, no obstante, demuestran la existencia de expresión del gen *pgi* en zona III del nódulo, y por tanto en bacteroides.

Para comprobar este resultado y al mismo tiempo comparar la expresión de SMc02163 en vida libre y simbiosis, decidimos analizar mediante Western blot los niveles de proteína PGI presentes en células de 1021 procedentes de un cultivo en fase

exponencial crecido en TY, con los presentes en bacteroides aislados de nódulos maduros (30 días tras la inoculación). La fracción bacteroidal obtenida según se describe en el apartado 4.7 de Material y Métodos se comprobó mediante observación en microscopio óptico confirmándose el enriquecimiento en células alargadas y pleiomórficas típicas de bacteroides, con respecto a una muestra de células de 1021 en vida libre (Fig. R.I.43).

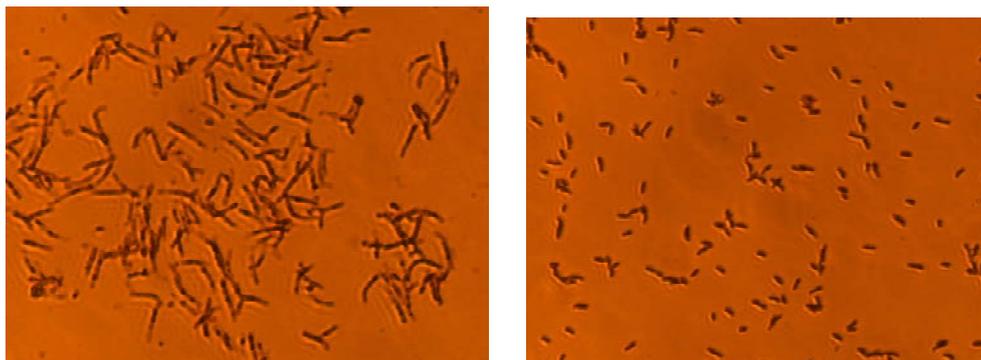


Figura R.I.43. Morfología de bacteroides (izquierda) y células en vida libre (derecha) de *S. meliloti* 1021.

Tras obtener extractos proteicos de ambas muestras, y analizar niveles similares de proteína total (2 y 4 μg), se pudo comprobar que existe proteína PGI en bacteroides de 1021 si bien se detectó una disminución del 42 % en el contenido en proteína PGI con respecto al detectado en células en vida libre (Fig. R.I.44)

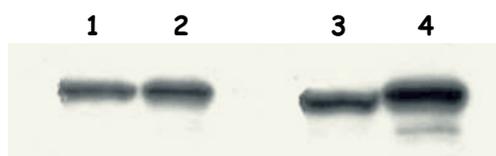


Figura R.I.44. Inmunodetección de PGI en extractos de bacteroides y células en vida libre de *S. meliloti* 1021. Carriles: **1.** bacteroides, 2 μg ; **2.** células en vida libre, 2 μg ; **3.** bacteroides, 4 μg ; **4.** células en vida libre, 4 μg .

CAPÍTULO I: ANEXO

Anexo I.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS CLONES pPGI400 y pPGI500

La estrategia llevada a cabo para obtener estas construcciones se representa de forma esquemática en la Figura A.I.1. A partir de ADN total de la cepa silvestre 1021 de *S. meliloti*, se amplificó un fragmento de 1,678 Kb que contenía el gen SMc02163 anotado como *pgi*, mediante el uso de los cebadores específicos pPGI-F y pPGI-R. El cebador pPGI-F se localiza a 7 nucleótidos del teórico codón de inicio del gen e incluye el teórico sitio de unión a ribosoma. El cebador pPGI-R se encuentra a 7 nucleótidos del teórico codón de parada.

pPGI-F: 5'-TTTCTAGATAGTTGCGATGCAAGGAGC-3'

XbaI

pPGI-R: 5'- TTTGGTACCTGACCGATCACTCCGATCG - 3'

KpnI

El producto amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar a la construcción pPGI4. Este plásmido se sometió a una digestión *XbaI-KpnI*, aprovechando las dianas de restricción presentes en los cebadores utilizados en la amplificación. Los extremos de los fragmentos resultantes de la digestión se hicieron romos mediante relleno (*XbaI*) y eliminación (*KpnI*) de colas 3'. Tras este proceso, el inserto de 1,7 Kb de pPGI4, se aisló y se clonó en el vector pBluescript II KS previamente digerido con *SmaI*, dando lugar a las construcciones pPGI40 y pPGI50 que sólo se diferenciaban en la orientación del inserto con respecto al polilinker del vector. El inserto de cada uno de estos plásmidos se aisló digiriendo inicialmente con *HindIII*, rellenando el extremo 3' para crear un extremo romo, y seguidamente digiriendo con *BamHI*. Los insertos así aislados de pPGI40 y pPGI50 se clonaron de forma independiente en el vector pTE3, previamente sometido a una primera digestión con *PstI* tras la cual se eliminó el extremo 3' protuberante para crear un extremo romo, y una segunda digestión con *BamHI*. De esta forma, se obtuvieron las construcciones pPGI400 y pPGI500. En pPGI500 la secuencia codificante de *pgi* se encuentra bajo el control del promotor del triptófano de pTE3, mientras en pPGI400 la secuencia *pgi* se halla en orientación contraria.

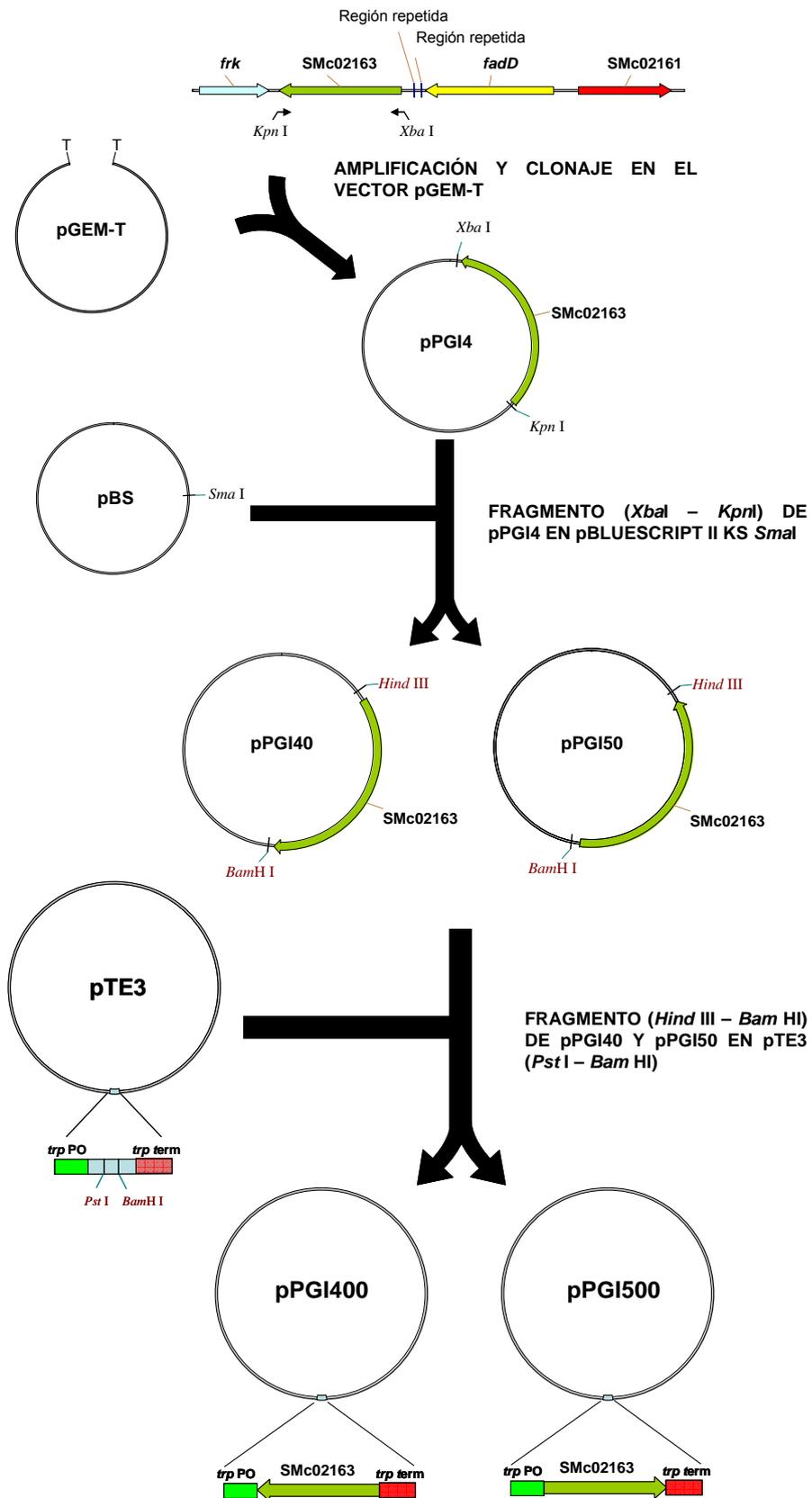


Figura A.I.1. Esquema de construcción de los clones pPGI400 y pPGI500

Anexo I.2. CONSTRUCCIÓN DE pSTEP4 Y pSUP202pol4pgi

La estrategia desarrollada para la obtención de estas dos construcciones utilizadas para conseguir la mutagénesis de SMc02163, se detalla en la Figura A.I.2. En ambos casos se partió del plásmido pBRPF1, un derivado de pBluescript II KS que contiene un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 7 Kb correspondiente a la región *fadD* de *S. meliloti*, y que incluye el gen SMc02163. pBRPF1 se sometió a una digestión *Bgl*III-*Sal*I, y se aisló un fragmento de 1,3 Kb que contiene el extremo 3' del gen *fadD* y el 5' del gen SMc02163. El fragmento de ADN aislado se clonó en el vector pBluescript II KS previamente digerido con *Bam*HI-*Sal*I dando lugar a la construcción pSTEP1. Mediante digestión *Eco*RV del clon pSTEP1 se generó una deleción de 318 bp en el gen *pgi*. En el sitio de la deleción se insertó el casete de resistencia a Sm/Spc del vector pHP45Ω previamente aislado mediante digestión *Sma*I, dando lugar al plásmido pSTEP2. A continuación, un fragmento *Sal*I de 1,887 Kb de pBRPF1, conteniendo el resto de la secuencia del gen SMc02163 se clonó en la orientación correcta en el único sitio *Sal*I de pSTEP2 para generar la construcción pSTEP3. Finalmente un fragmento *Eco*RV-*Xba*I de 4,6 Kb de pSTEP3 conteniendo toda la región de interés, se clonó o bien en el vector pK18*mobsacB* previamente digerido *Sma*I-*Xba*I dando lugar a la construcción pSTEP4, o bien en el vector pSUP202*pol4* digerido *Sma*I-*Xba*I para obtener el plásmido pSUP202*pol4pgi*. Tanto pK18*mobsacB* como pSUP202*pol4* son vectores suicidas, esto es, incapaces de replicarse en el fondo genético de *S. meliloti*. Las diferencias entre ambos vectores radican en que mientras pK18*mobsacB* es un vector que confiere resistencia a Km y sensibilidad a sacarosa por la presencia del gen *sacB*, pSUP202*pol4* confiere resistencia a Tc y no permite selección con sacarosa.

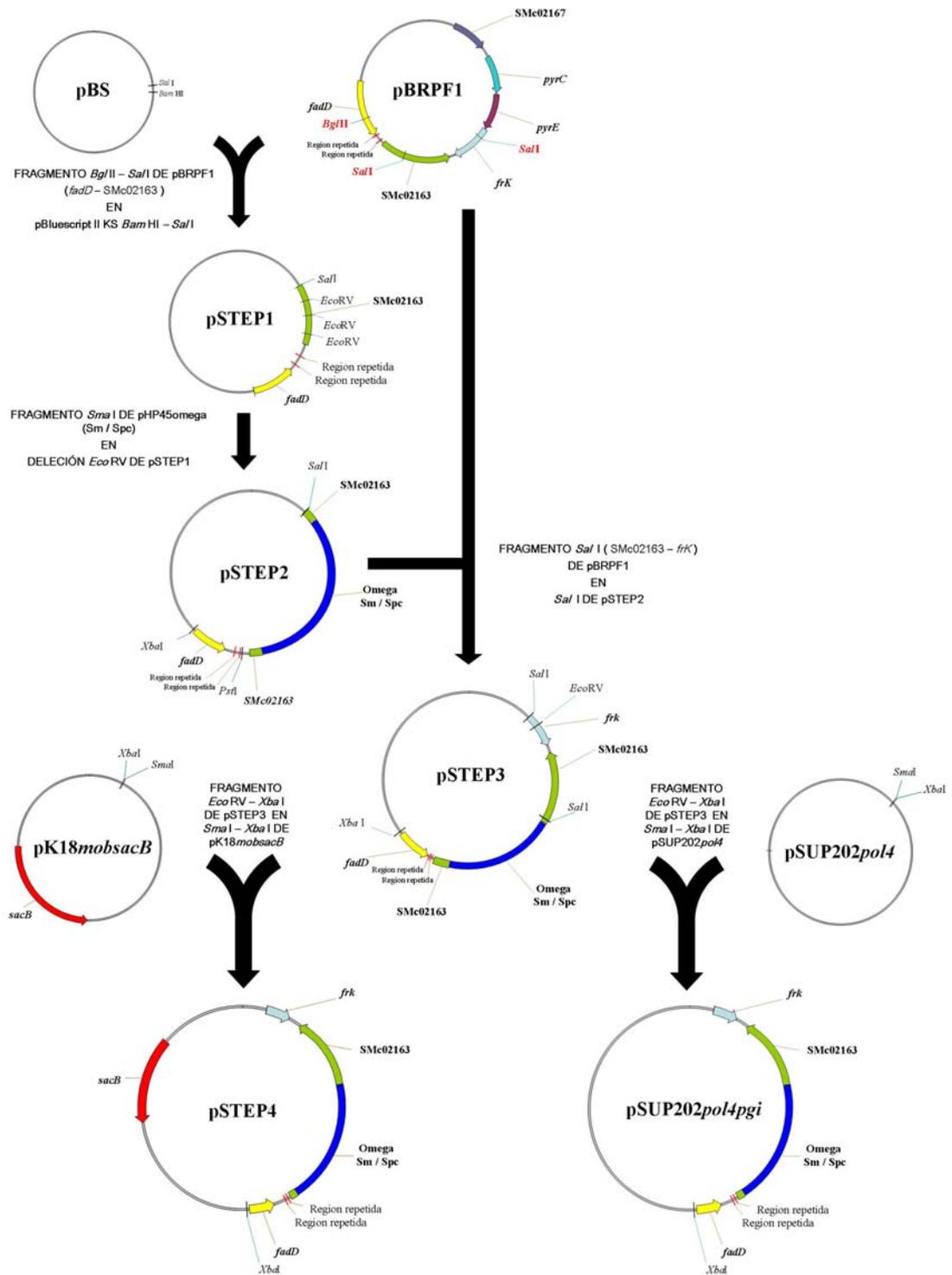


Figura A.I.2. Estrategia de obtención de los clones pSTEP4 y PSUP202pol4pgi utilizados en la mutagénesis del gen SMC02163 (*pgi*) de *S. meliloti*.

Anexo I.3. CONSTRUCCIÓN DEL CLON pTYB2-pgi

Para obtener esta construcción, se amplificó a partir de ADN total de la cepa silvestre 1021 de *S. meliloti*, un fragmento de 1,623 Kb correspondiente al marco de lectura abierto íntegro del gen SMC02163 de *S. meliloti*. Para ello se usaron los cebadores específicos Ov-PGI-F que incluye el ATG del gen en el sitio *NdeI* y Ov-PGI-R2:

Ov-PGI-F: 5' –GGTGGTCATATGAAAGCGCTTGTCGAAAAC-3'

NdeI

Ov-PGI-R2: 5' – CCCGGGGCGTGCCGCCTTCAGCAGC - 3'

SmaI

El producto amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar a la construcción pPGI6. Mediante digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *SmaI* se aisló el inserto de esta construcción y se clonó en el vector pTYB2 digerido previamente *NdeI-SmaI*, obteniendo el plásmido pTYB2-*pgi*.

Anexo I.4. CONSTRUCCIÓN DEL CLON pMPPGI

La región promotora del gen SMC02163 se obtuvo mediante el aislamiento de un fragmento *EcoRI-EcoRV* de 433 bp del plásmido pERP10. Dicho fragmento se clonó en el vector pMP220 digerido con *PstI* y posterior eliminación de colas 3' protuberantes para la creación de un extremo romo, seguido de la digestión con *EcoRI*, obteniendo finalmente la construcción pMPPGI.

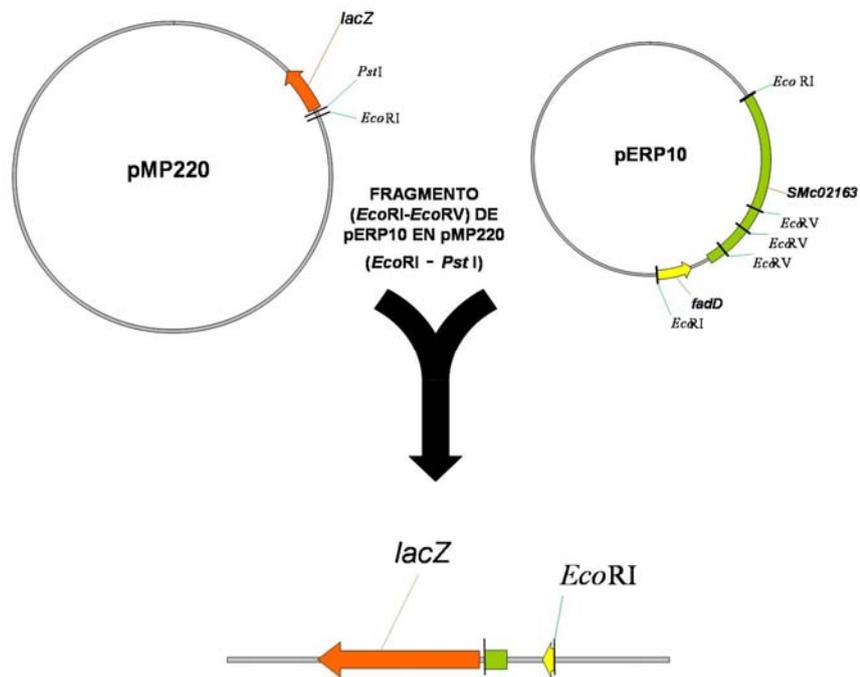


Figura A.I.3. Estrategia de obtención del clon pMPPGI utilizado para el análisis de la expresión del gen *SMc02163* (*pgi*) de *S. meliloti*.

CAPÍTULO I: DISCUSIÓN

La disponibilidad de la secuencia completa de los genomas de algunos rizobios ha permitido identificar en estos microorganismos la presencia de cientos de genes homólogos a factores de virulencia de bacterias patógenas (Van Sluys *et al.*, 2002). Se ha podido demostrar que algunos de estos genes de virulencia presentes en *Rhizobium* son esenciales para la correcta relación simbiótica con leguminosas, apoyando la idea de que bacterias patógenas y mutualistas podrían estar utilizando estrategias comunes dirigidas a la invasión e infección crónica del hospedador (revisado en Batut *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2006). Un ejemplo de este tipo de componentes es el gen *fadD* de *S. meliloti*, un elemento identificado por intervenir en la regulación de un tipo de migración multicelular (“swarming”) que tiene además un efecto en expresión génica y es necesario para el correcto establecimiento de simbiosis con plantas de alfalfa (Soto *et al.*, 2002). El gen homólogo a *fadD* de bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas*, denominado *rpfB*, participa junto con otra serie de genes *rpf* ligados a él, en la regulación de la expresión de factores de virulencia de la bacteria (Tang *et al.*, 1991; Fouhy *et al.*, 2006). En este trabajo hemos investigado si en *S. meliloti*, al igual que en *X. campestris*, el gen *fadD* está ligado a genes que puedan ser importantes para la interacción con la planta hospedadora. El análisis *in silico* de la región *fadD* de *S. meliloti* no ha identificado genes homólogos a los *rpf* de *Xanthomonas*. No obstante, la caracterización funcional del gen localizado aguas abajo a *fadD* ha puesto de manifiesto que al menos este gen (SMc02163 o *pgi*), es importante en el correcto establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

La comparación a nivel de secuencia de la región *fadD* de distintos rizobios, ha revelado la existencia de cierto grado de conservación. En cinco de los seis rizobios analizados, ligado a *fadD* se ha identificado un gen anotado como *pgi* (fosfoglucoisomerasa). La similitud no sólo se limita a la organización genética, sino que se extiende a las homologías mostradas por las correspondientes proteínas FadD y PGI, con identidades superiores al 62%. Sin embargo, sólo en el caso de *S. meliloti* hemos podido identificar en la región intergénica *fadD-pgi*, una secuencia RIME (**R**hizobium-specific **I**ntergenic **M**osaic **E**lement), a la que hemos bautizado como RIME3. Esta secuencia de ADN repetitivo no codificante parece ser un atributo del cromosoma de *S. meliloti*, algo que parece ser común a otras RIMEs (Osteras *et al.*, 1995; Viprey *et al.*, 2000), aunque también se han detectado algunas copias en el pSymB y en los genomas de otros rizobios. La función de estos elementos en mosaico, en general, se desconoce. No obstante, Osteras y colaboradores (1998) propusieron que

los dos elementos identificados en las regiones intergénicas *betIC* y *betBA*, podrían tener un posible papel en regulación postranscripcional del operón *bet* de *S. meliloti*. Si RIME3 desempeña alguna función en la regulación de la expresión de alguno de los genes de la región *fadD*, necesita ser investigado.

El gen *pgi* de *S. meliloti* (SMc02163) fue anotado como tal porque su teórico producto muestra homología con proteínas que tienen actividad fosfoglucoisomerasa (PGI). El estudio *in silico* y funcional realizado en este trabajo sobre la proteína SMc02163, confirman la validez de la anotación y además la clasifican dentro de la Subfamilia I de las denominadas PGI convencionales, grupo en el que se engloban proteínas eucariotas y de algunas bacterias. SMc02163, al igual que las PGIs de *E. coli* o de *Haemophilus influenzae*, tiene la particularidad de estar más relacionada con proteínas PGI de eucariotas que con las de otras bacterias. Esto podría significar que al igual que ha sido sugerido para los genes de *E. coli* y *H. influenzae*, SMc02163 podría tener un origen eucariota, habiendo sido adquirido por un ancestro bacteriano en un evento de transferencia genética (Katz, 1996).

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo fundamental de esta parte del trabajo era comprobar si SMc02163 desempeña algún papel durante la interacción con la planta hospedadora, una función que en principio podría pensarse carente de interés, al tratarse de un gen “housekeeping” como es el de la fosfoglucoisomerasa. Varias razones nos motivaron a adentrarnos en la caracterización molecular y funcional de SMc02163. Una de ellas fue la existencia de dos referencias en la literatura que relacionaban la actividad PGI de dos rizobios (*R. meliloti* y *R. phaseoli*) con la capacidad de establecer simbiosis efectiva con sus respectivas leguminosas. Así, mientras el mutante defectivo en actividad PGI de *R. meliloti* mostraba defectos en fijación de nitrógeno en simbiosis con plantas de alfalfa, el de *R. phaseoli* resultó ser incapaz de nodular plantas de judía (Arias *et al.*, 1979; Raleigh & Signer, 1982). Sin embargo, en estos estudios nunca se llevó a cabo una caracterización genética. Además, se ha descrito que *S. meliloti* dispone de otros dos genes que codifican proteínas con demostrada actividad PGI y que se transcriben *in vivo* durante el crecimiento en medio rico (Hansen *et al.*, 2005). Estos dos genes (uno cromosómico y otro localizado en el pSymB) codifican PGIs tipo cupin y se piensa que fueron adquiridos por *S. meliloti* en un evento de transferencia genética horizontal desde un ancestro de la bacteria termófila *Thermococcus*, y posterior duplicación del gen. *S. meliloti* junto con *S. enterica* serovar Typhimurium, son las únicas bacterias identificadas hasta la fecha que disponen de

proteínas PGI convencionales y tipo cupin. Conocer la contribución al metabolismo general de la bacteria y al establecimiento de la simbiosis de cada uno de los 3 genes de *S. meliloti* que codifican PGIs, resulta por tanto de particular interés. La tercera pero no menos importante razón que nos impulsó a caracterizar SMc02163, estaba en el hecho de que las PGIs convencionales se han descrito como proteínas “moonlighting”, proteínas capaces de desempeñar varias funciones, aparentemente no relacionadas (Tompa *et al.*, 2005). Así, la PGI de humanos, además de catalizar la isomerización reversible entre glucosa-6-P y fructosa-6-P, funciona como una citoquina, una proteína que participa en comunicación intercelular regulando diversas funciones. Entre las distintas actividades citoquina asociadas a PGI, nos resultó especialmente atractiva la actividad AMF (autocrine motility factor). AMF/PGI es una citoquina secretada exclusivamente por células cancerosas con un papel clave en el progreso de tumores y desarrollo de metástasis, al estimular la capacidad de migración, invasión, proliferación y supervivencia de las células (Funasaka & Raz, 2007). El hecho de que una PGI eucariota sea capaz de estimular migración celular nos hizo plantearnos la posibilidad de que SMc02163, una proteína PGI muy parecida a la de humanos, pudiera regular procesos de motilidad bacteriana como el swarming o incluso participar en la comunicación con la planta.

Hemos demostrado con distintas aproximaciones experimentales que SMc02163 codifica una proteína que funciona como PGI, catalizando la isomerización reversible entre glucosa-6-P y fructosa-6-P. En una primera aproximación, comprobamos que la presencia del gen SMc02163 consigue complementar el defecto en crecimiento y la actividad PGI de un mutante *pgi* de *E. coli*. Este resultado, aunque demuestra la funcionalidad de SMc02163 como PGI no es especialmente informativo, ya que se ha visto que la actividad PGI de *E. coli* en glucolisis puede ser sustituida no sólo por miembros de la familia PGI, sino también de la familia PGI/PMI y de las cPGI (Hansen & Schonheit, 2005). Probablemente, a pesar de la divergencia existente en la secuencia aminoacídica de estas proteínas, se hallan conservado determinadas regiones y residuos que permiten mantener una estructura tridimensional óptima para el centro activo del enzima, lo que hace que sean funcionalmente intercambiables.

La demostración más directa y convincente de la funcionalidad como PGI de SMc02163 se obtuvo *in vitro* tras la purificación de la proteína mediante técnicas de ADN recombinante. Hemos comprobado además, que sus propiedades bioquímicas son muy similares a las de otras proteínas PGI convencionales, entre ellas la de *E. coli* y

PGI humana. Al igual que éstas, SMc02163 forma dímeros, muestra una eficiencia catalítica del mismo rango y es inhibida por monosacáridos fosforilados, datos que contrastan con las características de la cPGI de *S. meliloti* codificada por SMc02042. Estos datos unidos a la gran homología de SMc02163 a nivel de estructura primaria con PGI convencionales, incluyendo la conservación de residuos clave en el sitio de unión al sustrato y del centro activo de este tipo de proteínas hacen suponer que el mecanismo de actuación sea semejante. Así, por analogía con PGIs cuya estructura cristalina ha sido determinada, la conformación de SMc02163 probablemente sea la de un homodímero con un motivo de empaquetamiento denominado α/β , en el que las dos subunidades se encuentran unidas mediante enlaces no covalentes a través de hélices α que rodean a un núcleo de láminas β plegadas y orientadas hacia el interior (Lee *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1999). El centro activo del enzima se genera tras la unión de ambos monómeros, mientras aminoácidos como la serina y la treonina cercanos a este centro activo serían los encargados de interactuar con los grupos fosfato del azúcar. Un residuo de histidina altamente conservado sería el encargado de llevar a cabo la rotura del anillo azucarado que conlleva la isomerización de cetosas y aldosas mediante la creación de un intermediario *cis*-endiol (Lee *et al.*, 2001).

Células de *S. meliloti* 1021 crecidas en medio rico muestran actividad PGI. En este trabajo, hemos demostrado que esta actividad desaparece casi por completo en una cepa en la que SMc02163 se ha inactivado. Este resultado además de confirmar la funcionalidad de la proteína SMc02163 en *S. meliloti*, sugiere que la actividad PGI predominante en la bacteria, al menos en las condiciones experimentales ensayadas, es la codificada por SMc02163. Puesto que ha sido descrito que los genes que codifican las 2 cPGI de *S. meliloti* se transcriben *in vivo* durante el crecimiento en medio complejo (Hansen *et al.*, 2005), la escasa actividad PGI detectada en el mutante *SMc02163*, muy probablemente es consecuencia de dos hechos: i) no haber utilizado las condiciones enzimáticas adecuadas para las cPGI, dependientes de cationes divalentes, y cuyas temperaturas óptimas se han calculado en 57°C para SMc02042 y 53°C para SMb20857 (Hansen *et al.*, 2005; Hansen & Schönheit, 2005), y ii) la baja eficiencia catalítica de las cPGI comparada con la de SMc02163, casi 6000 veces superior. Surge la lógica pregunta de cuál puede ser la función de las dos cPGI existentes en *S. meliloti*, máxime cuando estas proteínas tienen T^a óptimas entre 13-17°C por encima de la T^a óptima de crecimiento de la bacteria, y ésta dispone de una PGI convencional capaz de cubrir eficientemente sus necesidades metabólicas. Aunque no es descartable la posibilidad de

que estos genes sean simplemente reliquias adquiridas por *S. meliloti* que aún no ha llegado a perder, otra alternativa es que las cPGI sean relevantes para la bacteria a altas temperaturas a las que podría enfrentarse por ejemplo en situación de campo.

Especial mención merece la dificultad encontrada para obtener el mutante SMc02163 de *S. meliloti*. Aún no conocemos las razones por las cuales fue imposible el intercambio del alelo silvestre por el mutado haciendo uso de vectores suicidas y realizando la selección en medios que no dificultan el crecimiento de un mutante defectivo en actividad PGI. Además, Arias y colaboradores (1979) describieron el fenotipo de un mutante de *S. meliloti* carente de esta actividad, lo que hacía difícil sustentar la hipótesis de la esencialidad de PGI en el simbiote de alfalfa. Por otro lado, el hecho de que el intercambio alélico en el cromosoma sí fuera posible cuando el gen SMc02163 se encontraba presente en una construcción plasmídica, demostraba que la construcción utilizada para conseguir el intercambio, era correcta. Resulta curioso que el intercambio alélico fuese posible tanto en células en las que la copia en *trans* del gen SMc02163 se encontraba bajo la influencia del promotor del Trp (construcción pPGI500 en la que existe expresión constitutiva del gen), como en aquellas en las que el gen se encontraba en orientación contraria (construcción pPGI400, en la que la expresión del gen o es baja o no existe). Esto invita a sugerir que no es la existencia de actividad PGI lo que permite el intercambio alélico, sino que la presencia del ARN y/o ADN correspondientes a las construcciones derivadas de pTE3 conteniendo el gen SMc02163 parecen estar aliviando algún tipo de interferencia con el proceso de recombinación homóloga. Una posibilidad es que la secuencia RIME3 de la región intergénica *fadD-pgi*, presente en el cromosoma de la bacteria y en la construcción utilizada para la mutagénesis, pudiera interferir de algún modo en el proceso de recombinación homóloga requerida para que se produzca el intercambio alélico. En la bibliografía existente sobre *S. meliloti* se describe un caso similar. Osteras y colaboradores (1995) fueron incapaces de obtener mutantes por inserción en los genes *chvI* y *chvG* (*exoS*) de esta bacteria. Curiosamente, en la región intergénica *chvI-chvG/exoS*, se identificaron dos secuencias RIME: RIME1 y RIME2. El mutante SMc02163 sí se pudo conseguir mediante transducción generalizada con el fago ϕ M12, utilizando como cepa donadora aquella en la que se consiguió el intercambio alélico en presencia de una copia de SMc02163 en *trans*. Muy probablemente, las características intrínsecas del fenómeno de transducción pueden haber facilitado la obtención del mutante. Al igual que el intercambio alélico mediante el uso de vectores suicida, el

proceso de transducción requiere del sistema de recombinación del hospedador (*recA*) (Sternberg & Maurer, 1991). Sin embargo, la enorme capacidad de empaquetamiento del pseudovirión, aproximadamente 160 Kb para el fago ϕ M12, posibilita que la región homóloga sea en este caso de mayor longitud que los brazos clonados en el vector suicida (800 pb y más de 2 Kb), incrementando la frecuencia de recombinación, y quizás salvando los fenómenos de interferencia antes mencionados. Aunque se requieren experimentos adicionales para verificar o descartar la hipótesis de la posible interferencia de las RIMES en procesos de recombinación homóloga, nuestros resultados sugieren tener cautela a la hora de obtener conclusiones sobre la esencialidad de genes de *S. meliloti*, especialmente si existen cerca regiones con una estructura secundaria compleja.

La mutación en el gen SMc02163 conlleva en *S. meliloti* 1021 la aparición de un fenotipo pleiotrópico. En vida libre, la bacteria ha mostrado problemas en el crecimiento en determinados medios, menor producción de exopolisacáridos totales, y problemas de osmoadaptación a altas concentraciones de NaCl. En simbiosis con plantas de alfalfa, aunque la cepa 1021pgi es capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, presenta un retraso en el proceso infectivo que afecta negativamente la capacidad competitiva y eficiencia fijadora de la bacteria.

La inhibición del crecimiento mostrada por 1021pgi con fuentes de carbono tales como manitol o fructosa es concordante con un defecto en actividad PGI, ya que en *S. meliloti* la ruta Embden-Meyerhof-Parnas se halla ausente, y la degradación de estos azúcares a través de la ruta Entner-Doudoroff, requiere la participación de la isomerasa. El mutante además muestra cierta inhibición del crecimiento en medios definidos en los que existe una combinación de fuentes carbonadas permisivas y no permisivas, así como en medios complejos. Esta inhibición probablemente es consecuencia de la acumulación del sustrato de la reacción enzimática bloqueada, en este caso fructosa-6-P, que no puede ser metabolizado y que resulta tóxico para la célula al inhibir otras reacciones enzimáticas. Este efecto, en el que un sustrato cuyo catabolismo se encuentra bloqueado en un punto, inhibe el crecimiento de la bacteria a expensas de otros compuestos, es común. Entre otros, se ha descrito en *E. coli* (Fraenkel, 1968) y también en el mutante de *S. meliloti* defectivo en actividad PGI descrito por Arias y colaboradores (1979). En el caso de *S. meliloti* se pudo comprobar la existencia de una considerable acumulación de fructosa-6-P, cuando la bacteria se

exponía a fructosa o xilosa. Sólo después de una incubación prolongada, la concentración de fructosa-6-P bajaba, con la consiguiente recuperación del crecimiento.

Al igual que ha sido descrito para otros dos rizobios defectivos en actividad PGI (Arias et al., 1979; Raleigh & Signer, 1982), 1021pgi produce menos polisacáridos extracelulares (EPS) que la cepa silvestre, si bien el defecto no es tan acusado. Mientras el mutante de *R. phaseoli* resultó ser EPS⁻, y el de la cepa L5-30 de *S. meliloti* producía 5 veces menos EPS que la cepa silvestre, 1021pgi produce el 72% del polisacárido sintetizado por la cepa parental. El defecto observado en producción de EPS en un mutante defectivo en PGI no es de extrañar teniendo en cuenta que el precursor para la síntesis de muchos de estos polisacáridos es la glucosa-6-P (Becker & Pühler, 1998), y la síntesis de este monosacárido fosforilado a partir de compuestos distintos de la glucosa, requiere la participación de PGI. En ningún caso, sin embargo, se ha investigado qué polisacárido/s se ve/n afectado/s en su síntesis y/o acumulación como consecuencia de la deficiencia en actividad PGI. La diferencia cuantitativa observada entre nuestros datos y los obtenidos por Arias y colaboradores (1979) podría tener varias explicaciones. La primera de ellas es que en el caso de Arias y colaboradores, el mutante fue obtenido por mutagénesis química y no puede descartarse la existencia de mutaciones adicionales a la actividad PGI que afectaran a genes implicados directamente en la síntesis de EPS. Otra posible explicación estaría en el uso de distintas cepas de *S. meliloti*, con diferentes características genéticas relacionadas con la regulación de la síntesis de EPS. Así, mientras la cepa 1021 utilizada en nuestro estudio es *expR*⁻ (gen que codifica un regulador tipo LuxR esencial en la síntesis de galactoglucano o EPSII y que controla también la biosíntesis de succinoglucano o EPSI (Pellock et al., 2002; Glenn et al., 2007), la cepa L5.30 parece disponer de un gen *expR* funcional (MJ Soto, datos no publicados), por lo que es probable que L5.30 produzca más EPS que 1021 en determinadas circunstancias. En cualquier caso, el hecho de que la sobreexpresión del gen SMc02163 en 1021pgi conlleve a una acumulación de polisacárido extracelular más de 100 veces superior a la observada para la cepa silvestre, apoya la hipótesis de que el gen SMc02163 desempeña un papel en la síntesis de estos EPS.

El defecto en síntesis y/o acumulación de EPS observado en el mutante 1021pgi, podría ser una de las razones por las que esta bacteria tiene problemas para crecer en presencia de altas concentraciones de NaCl. Varios estudios han demostrado que una de las respuestas osmoadaptativas de *S. meliloti* en medios hipersalinos consiste

en inducir la síntesis de EPSI de bajo peso molecular y la de EPSII (Rüberg *et al.*, 2003; Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). El hecho de que la cepa 1021pgi muestre problemas de crecimiento en un medio con alta concentración de NaCl, sugiere la participación de SMc02163 en la osmoadaptación de *S. meliloti*, probablemente al ser clave en el mantenimiento de un pool de precursores necesarios para la síntesis de EPS. Un dato más que parece avalar el papel de SMc02163 en la respuesta a un estrés osmótico es la mayor expresión que hemos observado de este gen en condiciones hiperosmóticas. En *E. coli* también se ha asociado la ausencia de la actividad PGI con un defecto en osmoadaptación de la bacteria (Böhringer *et al.*, 1995). Estos mismos autores, han observado que la ausencia de un gen *pgi* funcional conlleva en *E. coli*, una mayor expresión basal de genes osmorregulados como *otsBA* (implicados en la síntesis del osmoprotector trehalosa), pero menor inducibilidad osmótica de éstos, fenómenos que se han relacionado con la carencia en el mutante de UDP-glucosa. En *S. meliloti* la ausencia de actividad PGI no incrementa la expresión basal del gen *otsA*, principal gen implicado en esta bacteria en la acumulación de trehalosa a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-P, necesaria para la adaptación a medios hiperosmóticos (A. Domínguez, 2007). En cambio, sí hemos observado inducibilidad y mayor expresión de este gen en 1021pgi con respecto a la cepa silvestre, cuando la bacteria se somete a un estrés osmótico en un medio en el que la síntesis de trehalosa pudiera hallarse comprometida. Curiosamente, se ha comprobado que la mayor expresión del gen *otsA* en *S. meliloti* tiene lugar en condiciones en las que no se produce la máxima acumulación de trehalosa (A. Domínguez, 2007). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que los problemas de osmoadaptación observados en 1021pgi podrían ser el resultado del defecto en producción de EPS y/o trehalosa.

El fenotipo simbiótico obtenido para la cepa 1021pgi sugiere una importante conexión entre la presencia del gen SMc02163 y el correcto establecimiento y estado funcional de la simbiosis. Aunque la bacteria es capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, presenta un retraso en el proceso infectivo que afecta negativamente la capacidad competitiva y eficiencia fijadora de la bacteria. Existen ejemplos en la literatura donde se ha establecido una conexión entre la presencia del gen *pgi* y la capacidad de la bacteria de establecer interacción con un hospedador. Es el caso de dos especies del patógeno vegetal *Xanthomonas*, donde PGI parece ser importante en el crecimiento de la bacteria dentro del hospedador y en la expresión de síntomas de enfermedad, llegando incluso a ser esencial en la virulencia de *X. axonopodis* pv. *citri*

(Tung & Kuo, 1999). En esta bacteria además, se ha observado que extractos vegetales inducen de forma coordinada al gen *pgi* y los genes *hrp*, genes requeridos en interacciones patogénicas. Aunque no se descarta la implicación de *pgi* en la producción de factores de virulencia en estos fitopatógenos, lo más probable es que el defecto en patogénesis sea una consecuencia del defecto en crecimiento causado bien por la imposibilidad de aprovechar la fuente de carbono que es utilizada mayoritariamente por la bacteria *in planta* (xilosa en el caso de *X. oryzae* pv. *oryzae*), bien por la interferencia que pueda crear la presencia en la planta de azúcares no utilizables por el mutante.

Hemos investigado cuáles son las posibles causas del defecto simbiótico mostrado por 1021*pgi*, analizando su comportamiento en algunas de las etapas tempranas de la interacción simbiótica y comparándolo con el de la cepa silvestre. Así, hemos comprobado que el defecto en el proceso infectivo no es consecuencia de una limitación en la expresión de genes *nod*, los cuales sorprendentemente parecen expresarse algo más en el fondo mutante. Este efecto podría deberse a una menor concentración en 1021*pgi* de algún aminoazúcar cuya síntesis se encuentre limitada por la ausencia de actividad PGI ya que sabemos que precursores monosacáridos de los factores Nod tales como la glucosamina y la N-acetilglucosamina disminuyen la expresión de genes *nod*, con un efecto que es dependiente de dosis (MJ Soto, no publicado). Si el efecto observado en transcripción se traduce en una mayor producción de factores Nod y/o una alteración en su composición, no ha sido investigado. Sí hemos constatado que el mutante 1021*pgi* se encuentra severamente limitado en los procesos de adsorción y colonización de raíces de alfalfa. La adsorción bacteriana al pelo radical es un proceso complejo en el que participan numerosos factores (Matthysee & Kijne 1998; Laus *et al.*, 2006). En una primera etapa participan adhesinas bacterianas y/o lectinas vegetales capaces de unirse a determinados polisacáridos de superficie de *Rhizobium*, mientras que en una segunda etapa se produce un anclaje mediado por fibrillas de celulosa de la bacteria. Aunque desconocemos si la mutación a nivel del gen SMc02163 ha afectado de manera cualitativa a los polisacáridos de superficie de *S. meliloti*, como hemos mencionado anteriormente, datos cuantitativos han puesto de manifiesto un menor contenido en EPS en la cepa 1021*pgi*. Una posible hipótesis es que el menor porcentaje de adsorción que muestra la cepa mutante fuese debido a una disminución en los niveles y/o alteración de las características de aquellos polisacáridos más directamente implicados en la interacción con la planta.

La escasa capacidad de colonización de raíces de alfalfa observada en 1021pgi durante las primeras 24 horas tras la inoculación podría ser una consecuencia del defecto en adsorción. No obstante, otros aspectos del fenotipo mostrado por 1021pgi también podrían explicar este defecto. Por un lado, la composición compleja y variada de los exudados radicales de la planta en los que se sabe existen fuentes de carbono no utilizables por 1021pgi como fructosa, ribosa o xilosa (Dakora & Phillips, 2002), pueden contribuir a inhibir temporalmente el crecimiento de la bacteria por acumulación de fructosa-6-P. Como ya ha sido referido, la inhibición del crecimiento de 1021pgi en medios de laboratorio que contienen una mezcla de fuentes de carbono utilizables y no utilizables por esta bacteria, se recupera después de una incubación prolongada. De manera análoga, la capacidad de colonización de 1021pgi se recupera notablemente 48 horas después de la inoculación, y aunque aún se observa una cierta diferencia con respecto a la cepa silvestre, ésta ya no es estadísticamente significativa. Además, los problemas de osmoadaptación que muestra 1021pgi en medios con alta concentración de sal también podrían explicar su escasa capacidad de colonización. Se ha propuesto que la rizosfera de la planta puede constituir un entorno hiperosmótico como consecuencia de la actividad del vegetal en la que hay liberación de exudados, captación de agua y extrusión de sodio (Miller & Word, 1996). Este ambiente hiperosmótico podría enlentecer el crecimiento del mutante en la superficie de la planta dificultando así su colonización.

No hemos investigado si alguna otra etapa en el desarrollo de la simbiosis se encuentra alterada en el mutante, aunque la menor producción de EPS podría causar efectos adicionales. Hemos comprobado que en el interior del nódulo, 1021pgi es capaz de diferenciarse en bacteroide, que salvo por la presencia de unas vesículas de naturaleza desconocida, tiene una ultraestructura similar a la de la cepa silvestre. Estos bacteroides son capaces de fijar N, si bien la actividad máxima de la nitrogenasa se alcanza desfasada en el tiempo con respecto a la actividad observada en la cepa silvestre, probablemente como consecuencia del retraso arrastrado desde las etapas tempranas de la interacción. Muy probablemente, es el retraso en la aparición de la máxima actividad nitrogenasa, el responsable del menor peso seco y contenido en nitrógeno de la parte aérea de plantas inoculadas con el mutante, aunque no podemos descartar algún otro defecto añadido. Otro aspecto destacable de los nódulos inducidos por 1021pgi es el retraso en la aparición y el menor tamaño de la zona de senescencia típica de nódulos indeterminados maduros. No podemos saber si este efecto es

consecuencia directa de la ausencia en la bacteria de la proteína SMc02163 o indirecta por el retraso existente desde un inicio en el proceso simbiótico, ya que en nuestros estudios no hemos incluido un control adecuado. El hecho de que en humanos se hayan relacionado los niveles de PGI/AMF con el control de la senescencia inducida por estrés oxidativo en células tumorales (Funasaka *et al.*, 2007), nos hace especular con que quizás haya una relación directa que puede ser interesante investigar.

La expresión del gen SMc02163 en condiciones de vida libre se encuentra influenciada por dos factores: la fase de crecimiento bacteriano y la presencia de condiciones de estrés osmótico. El hecho de que la presencia de altas concentraciones de sal incrementen la expresión del gen, sugieren una posible función de SMc02163 en condiciones hipersalinas, quizás al participar en la síntesis de precursores de EPS y trehalosa, como se ha mencionado previamente. Desconocemos sin embargo, el significado de la reducción en la expresión de SMc02163 tras la entrada en fase estacionaria de crecimiento, aunque lo más probable es que sea un reflejo del enlentecimiento general que sufre el metabolismo de la bacteria como mecanismo de supervivencia en un ambiente pobre en nutrientes. SMc02163 parece expresarse en distintos estadios del desarrollo del nódulo, aunque hemos observado una reducción de la expresión del gen en bacteroide con respecto a células en vida libre. Esta reducción sin embargo no puede ser atribuida a la utilización preferente de ácidos dicarboxílicos por el bacteroide (Prell & Poole, 2006), ya que al menos en vida libre la naturaleza de la fuente de carbono utilizada por la bacteria no influye notablemente en la expresión de este gen.

Sin duda, el resultado más sorprendente de nuestro trabajo ha sido la constatación de que una proteína (SMc02163) de una bacteria (*S. meliloti*) muestre *in vitro* una actividad (citoquina) asociada a organismos eucariotas complejos. Hemos demostrado que SMc02163, al igual que la proteína PGI de humanos tiene el potencial de mostrar actividad AMF, incrementando la capacidad invasiva de células tumorales, poniendo así en entredicho la idea de que la función citoquina sea específica de proteínas PGI de mamíferos (Amraei & Nabi, 2002). Quedaría por comprobar si esta actividad se extiende a más líneas tumorales, o si al igual que la proteína PGI de *Bacillus*, la actividad citoquina está limitada a determinados tipos celulares dependiendo del tipo de receptor AMFR que muestren. Investigaciones en este sentido podrían aportar información para posibles terapias contra el cáncer.

En cualquier caso, nuestro resultado plantea la cuestión de si en *S. meliloti*, SMc02163 también ejerce como una proteína multifuncional, y si es así cuál es esa función, cuándo se ejerce y con qué objetivo. En mamíferos, la actividad que desarrolla PGI viene determinada por su localización. En el interior de las células, PGI participa en glucolisis y gluconeogénesis catalizando la isomerización reversible entre glucosa-6-P y fructosa-6-P. La sobre-expresión de PGI desencadena la secreción de la proteína que pasa a participar en fenómenos de comunicación intercelular regulando diversas funciones tras la activación de receptores específicos de membrana. Hemos intentado comprobar si SMc02163 es secretada por *S. meliloti*. En vida libre no hemos encontrado el sistema que nos permita diferenciar entre proteína realmente secretada o aquella procedente de rotura celular, mientras que en simbiosis, desafortunadamente, los anticuerpos policlonales anti-SMc02163 no han permitido detectar la proteína en secciones de nódulos. Esto puede ser consecuencia, bien de una muy baja expresión de la proteína, bien porque los anticuerpos que fueron purificados selectivamente frente a la forma desnaturalizada de la proteína, no reconozcan los motivos antigénicos de la forma nativa.

Es tentador especular con la idea de que si SMc02163 fuera secretada, pudiera, al igual que PGI de mamíferos, participar en comunicación intercelular dentro de la población bacteriana y/o con la planta. Hemos analizado una posible relación entre la presencia de esta proteína y la capacidad de la bacteria de mostrar swarming, un tipo de motilidad que es dependiente de densidad celular y por tanto de comunicación intercelular. Sin embargo, no hemos visto diferencias en la frecuencia de aparición de swarming condicional entre cepa silvestre, mutante o cepa que sobre-expresa el gen. Con respecto a una función ejercida sobre la planta, los fenotipos observados asociados a SMc02163 han sido una menor eficiencia simbiótica de las plantas inoculadas con el mutante 1021pgi y menos síntomas de senescencia en nódulos ocupados por esta bacteria. Dado el fenotipo pleiotrópico mostrado por 1021pgi, es difícil asignar directamente estos fenotipos a SMc02163 por lo que para confirmar la hipótesis de una función directa sobre la planta se requieren experimentos adicionales incluyendo los controles adecuados.

CAPÍTULO II: RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA REGIÓN *virB* PRESENTE EN EL PLÁSMIDO pSymA DE *S. meliloti*

1. ANTECEDENTES

La secuenciación del genoma de *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) reveló la existencia en el plásmido simbiótico pSymA de una región en la que se localizan once genes homólogos a genes *virB* descritos en distintas bacterias. Los genes *virB* codifican los componentes de un sistema de secreción tipo IV (T4SS), un complejo multiproteico compuesto de hasta 11 proteínas que forman un canal que atraviesa la envoltura bacteriana, a través del cual se pueden transportar proteínas y/o nucleoproteínas. El prototipo es el sistema VirB del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, un T4SS mediante el cual tiene lugar el transporte de un complejo nucleoproteico (complejo T) responsable de la transformación genética de la célula vegetal que finaliza con la formación de tumores o agallas (Christie *et al.*, 2005). Los T4SS son extraordinariamente versátiles, tanto por la naturaleza del sustrato transportado (proteína o complejos ADN-proteína), como por la diversidad del destino de dicho sustrato: bacteria, hongo, planta, animal, o el medio externo.

Desde el punto de vista funcional, los T4SS se clasifican en tres subgrupos (Cascales & Christie, 2003; Ding *et al.*, 2003): i) en el subgrupo más numeroso encontramos los sistemas de conjugación bacteriana, los cuales transfieren ADN a una célula receptora tras establecer contacto físico directo con ella. Algunos ejemplos representativos de este grupo son los sistemas Tra, Trb y Trw de plásmidos de *E. coli*; ii) sistemas de captación de ADN como el ComB de *Helicobacter pylori*, y liberación de ADN al medio externo como el Tra de *Neisseria gonorrhoeae*, y iii) sistemas implicados en la translocación de efectores, indispensables en el proceso de infección de numerosos patógenos animales y vegetales. La mayoría de estos sistemas inyectan los sustratos directamente en el citoplasma de la célula eucariótica, de forma parecida a como lo hacen los sistemas de secreción tipo III (T3SS). No obstante, también pertenece a este grupo el sistema Ptl de *Bordetella pertussis*, que exporta su sustrato (toxina pertúsica) al medio sin necesidad de que exista contacto con la célula hospedadora. Algunos T4SS pueden estar implicados en más de una función. Es el caso del sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens* o el Dot/Icm de *Legionella pneumophila* que además de participar en la translocación de efectores a sus hospedadores correspondientes, son

capaces de mediar la transferencia conjugativa del plásmido heterólogo RSF1010 (Chen *et al.*, 2002; Christie, 2001). Por otro lado, en una misma bacteria pueden existir distintos T4SS con funciones diversas. Así, en *A. tumefaciens* se han identificado hasta tres T4SS: los sistemas Trb y VirB/D4 del plásmido Ti, y el sistema AvhB del plásmido críptico pAtC58. El sistema Trb participa en la transferencia conjugativa del plásmido Ti. VirB/D4, como se ha mencionado anteriormente, media la translocación del complejo T a la célula vegetal, y el sistema AvhB ha sido implicado en la transferencia conjugativa del plásmido pAtC58 (Chen *et al.*, 2002). *H. pylori*, el agente infeccioso de numerosos trastornos gástricos crónicos, presenta también dos T4SS, el sistema Cag y el sistema ComB, encargados de la translocación de efectores y de la captación de ADN, respectivamente (Bourzac & Guillemin, 2005; Hofreuter *et al.*, 2001).

La estructura del sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens* está bastante bien estudiada y en ella se distinguen tres componentes que actúan de manera coordinada en las distintas etapas de la translocación: la proteína acopladora (CP), el complejo transmembrana y un filamento extracelular o pilus. Los dos últimos componentes conforman el sistema Mpf (Mating-pore-formation) o complejo del poro. (Fig. R.II.1) (Cascales & Christie, 2003; Backert & Meyer, 2006). Estos componentes se ensamblan en el polo de la célula (Judd *et al.*, 2005). Mientras la CP es la encargada de poner en contacto el ADN y/o proteínas con la maquinaria de la transferencia, el sistema Mpf lleva a cabo el transporte a través de la envoltura y la liberación de los sustratos a la célula diana.

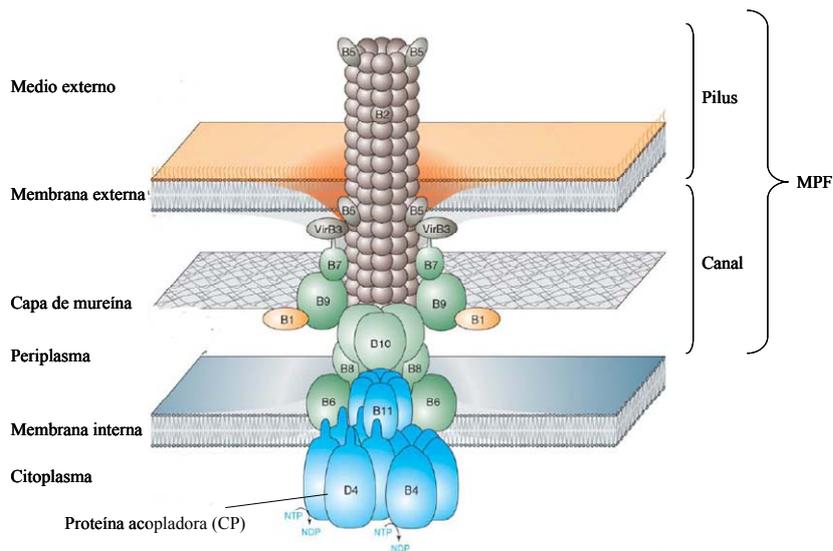


Figura R.II.1. Arquitectura del sistema de secreción tipo IV (VirB/D4) de *A. tumefaciens*. (Tomado de Backert & Meyer, 2006).

La naturaleza de los sustratos secretados por los T4SS es mayoritariamente proteica y se cree que en el caso de complejos nucleoproteicos el ADN no es más que un pasajero que utiliza el sistema de secreción existente. No existen rasgos identificativos de los sustratos transportados por estos sistemas dándose una gran variación en el tamaño (desde 22 kDa de VirF a 145 kDa de CagA), composición en subunidades, o plegamiento. No obstante, para un T4SS dado es posible que existan señales de reconocimiento. Así los sustratos secretados por el sistema VirB/D4 de *Agrobacterium* parecen disponer de una señal de secreción dentro de los 50 aminoácidos del C-terminal, siendo ésta una región con carga positiva (Vergunst *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha intensificado el estudio de T4SS por tener un papel crucial en la virulencia de bacterias patógenas. En estos microorganismos, los efectores secretados por estos sistemas se han implicado en la supresión de reacciones de defensa, en facilitar el crecimiento intracelular e incluso inducir la síntesis de nutrientes que facilitan la colonización bacteriana (Cascales & Christie, 2003). Aunque los más estudiados han sido T4SS de patógenos de animales, existen evidencias de que los T4SS también pueden tener un papel en la virulencia de fitopatógenos distintos de *Agrobacterium* como es el caso de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* y *Burkholderia cenocepacia* (Bell *et al.*, 2004; Engledow *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2006).

Entre los rizobios se han identificado genes *virB* que podrían codificar T4SS en los genomas de *S. meliloti* (Barnett *et al.*, 2001), *R. etli* (González *et al.*, 2003), varias cepas de *M. loti* (Hubber *et al.*, 2004), y en *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Krehenbrink & Downie, 2008). Hasta la fecha sólo se ha demostrado un papel en simbiosis para el sistema VirB/D4 de *M. loti* R7A (Hubber *et al.*, 2004). El T4SS de *M. loti* promueve o impide la nodulación dependiendo de cuál es la leguminosa hospedadora, función similar a la descrita para los T3SS de otros rizobios. Se han identificado dos posibles efectores del T4SS de *M. loti*: Msi059 y Msi061 que muestran similitudes con efectores conocidos de T3SS y T4SS de bacterias patógenas de plantas. Se cree que estos efectores participan en procesos de degradación de proteínas en la célula hospedadora (ver apartado 2.3 en Introducción).

Al igual que otros procesos de gran complejidad para la célula, la expresión de los T4SS se encuentra altamente regulada. En los sistemas estudiados hasta la fecha, los genes que codifican T4SS suelen ser activados tras la percepción de ciertas señales ambientales. Así, en *A. tumefaciens*, compuestos fenólicos liberados por células

vegetales heridas y monosacáridos que participan en síntesis de la pared celular, son responsables de activar el sistema regulador de dos componentes VirA/VirG que a su vez induce la expresión del regulón *vir*. La inducción es además estimulada por la existencia de bajas concentraciones de fosfato y un pH ácido (revisado en Christie, 2004; Brencic & Winans, 2005). Una vez integrado y expresado el ADN-T, se ha descubierto que la expresión de los genes *vir* es reprimida por la acción del ácido indolacético, uno de los productos resultantes de la transformación vegetal (Liu & Nester, 2006). En patógenos intracelulares de animales como es el caso de *Brucella*, las condiciones presentes en el interior del fagosoma, como el choque ácido o la limitación de nutrientes, parecen ser las señales esenciales necesarias para la inducción del T4SS (Boschiroli *et al.*, 2002; Dozot *et al.*, 2006). Señales de quorum sensing, que regulan la expresión de diversos genes en función de la densidad celular, también han sido implicadas en el control de la expresión de genes *virB*, como ocurre con los genes que codifican el T4SS de *B. melitensis* (Taminiau *et al.*, 2002 ; Ranbow-Larsen *et al.*, 2008), *B. suis* (Delrue *et al.*, 2005) o el sistema Trb de *Agrobacterium*, encargado de la transferencia conjugativa del plásmido Ti (He & Fuqua, 2006). En el caso de los rizobios, sólo existen datos relacionados con la expresión de genes que codifican T4SS en *S. meliloti* y en *M. loti*. En un estudio transcriptómico realizado con macroarrays, y tomando como referencia la expresión en bacterias en vida libre, se detectó la inducción de algunos genes *virB* de *S. meliloti* en nódulos jóvenes de *M. truncatula* y en nódulos de mutantes bloqueados en etapas simbióticas anteriores a la de diferenciación en bacteroide (Ampe *et al.*, 2003), sugiriendo que la región *virB* se expresa preferencialmente durante el proceso de infección. En el caso de *M. loti*, se sabe que la expresión del T4SS está controlada por una cascada reguladora en la que participa un sistema VirA/VirG similar al de *Agrobacterium* cuya expresión es estimulada por NodD1 en respuesta a señales de la planta, consiguiéndose así que la expresión de los genes *vir* ocurra durante las primeras etapas del proceso de nodulación (Hubber *et al.*, 2007). Por analogía con *Agrobacterium*, se ha sugerido además que la activación de VirG por VirA requiere la detección de señales de origen vegetal, quizás compuestos relacionados con la degradación y síntesis de pared celular asociada al desarrollo de los canales de infección durante el proceso de nodulación.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN *virB* DE *S. meliloti*

Para el estudio de la región *virB* de *S. meliloti* se llevaron a cabo distintas aproximaciones:

2.1. Análisis *in silico* de la región *virB* de *S. meliloti*

La región *virB* de *S. meliloti* 1021 está compuesta por 11 genes anotados como *virB1-virB11* en función a su similitud con el sistema VirB del plásmido Ti de *Agrobacterium* (Barnett *et al.*, 2001). Sin embargo, un análisis más detallado pone de manifiesto que los homólogos más cercanos a los genes *virB* de *S. meliloti* 1021, son los genes *avhB* presentes en el plásmido críptico pAtC58 de *A. tumefaciens* (Chen *et al.*, 2002), los genes *virB* del plásmido simbiótico p42d de *R. etli* (González *et al.*, 2003) y los genes *virB* del plásmido 1 de la bacteria *Mesorhizobium* sp. BNC1 (Figura R.II.2.). Asimismo, resulta llamativa la homología con el sistema VirB de dos patógenos intracelulares en animales tales como *Bartonella henselae* y en menor grado con *B. suis*. Interesantemente, se ha demostrado que los T4SS de distintas especies de *Bartonella* y *Brucella* son necesarios para que estas bacterias puedan persistir en el interior de la célula hospedadora (O'Callaghan *et al.*, 1999; Schulein & Dehio, 2002)

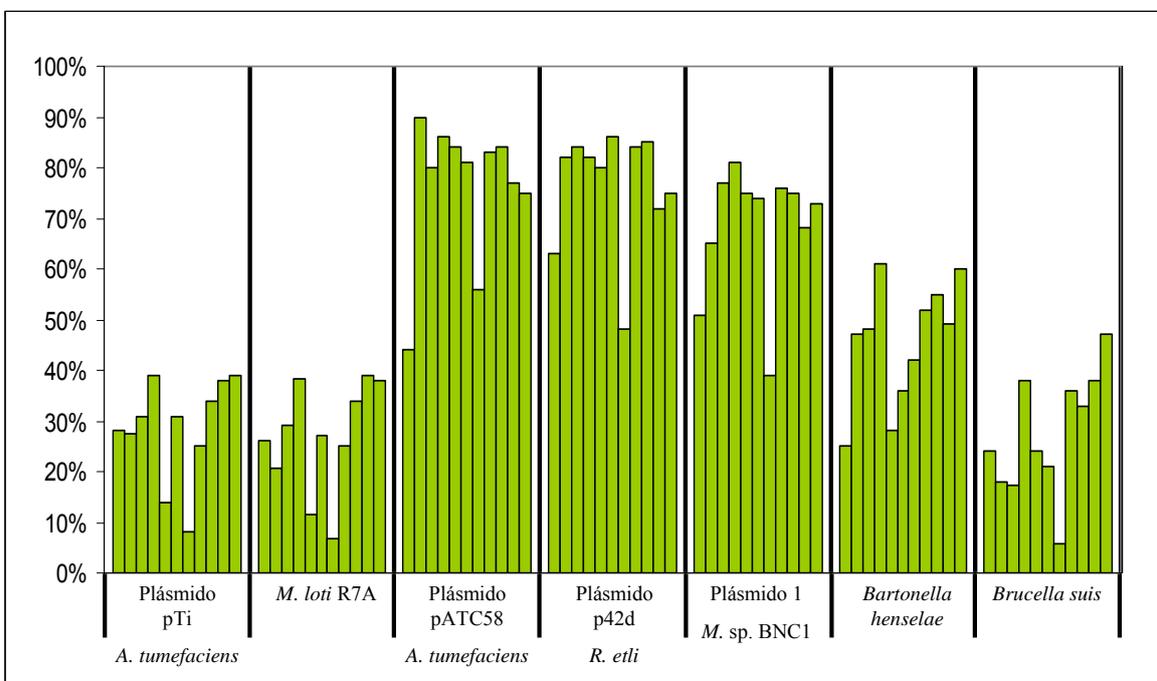


Figura R.II.2. Representación gráfica del porcentaje de identidad de cada uno de los productos VirB de *S. meliloti* (VirB1 a VirB11 de izquierda a derecha) con sus correspondientes ortólogos en distintas bacterias.

Localizados aguas arriba y adyacentes a la región *virB* de *S. meliloti* se encuentran dos genes SMA1322 y SMA1323 que parecen estar también presentes en las regiones *virB* del plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens*, del plásmido simbiótico de *R. etli*, así como en el plásmido 1 de *Mesorhizobium* sp. BNC1, manteniéndose en todos ellos la misma organización genética (Fig. R.II.3.). Por su proximidad a *virB1* (el codón de parada de SMA1322 se encuentra separado por sólo 3 nucleótidos del codón de inicio de *virB1*), el gen SMA1322 probablemente forma parte del mismo operón que los genes *virB1-virB11* y codifica una proteína de 172 aminoácidos de función desconocida que muestra un 63, 57, y 56 % de identidad con las correspondientes proteínas homólogas presentes en *R. etli*, *Agrobacterium*, y *Mesorhizobium* sp., respectivamente. El programa SignalP 3.0 predice la existencia de un péptido señal ($p=0,853$) correspondiente a los primeros 28 aminoácidos, sugiriendo que pueda ser una proteína secretada. Proteínas muy parecidas a SMA1322 y también asociadas a teóricos T4SS se encuentran en el plásmido pXAUT01 de *Xanthobacter autotrophicus* (Xaut5090, 56% de identidad), en *R. leguminosarum* biovar trifolii (RlegDRAFT_1129, 55% de identidad), y en el cromosoma 1 de *Ochrobactrum anthropi* (Oant_0673, 54% de identidad).

El gen SMA1323 se localiza aguas arriba de SMA1322 transcribiéndose en sentido contrario al operón *virB*. La teórica proteína de 122 aminoácidos codificada por este gen muestra un 61, 54, y 49 % de identidad con sus correspondientes homólogas en *A. tumefaciens*, *R. etli* y *Mesorhizobium* sp., respectivamente. Proteínas muy homólogas a SMA1323 parecen encontrarse también presentes en *O. anthropi* (Oant_0672, 60 % de identidad), *X. autotrophicus* (Xaut5091, 57 % de identidad) y en el plásmido pRL10 de *R. leguminosarum* biovar viciae 3841 (pRL100314, 59% de identidad). Recientemente se ha demostrado que el homólogo a SMA1323 en *R. etli*, el gen *rctA* (yp038), está implicado en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de esta bacteria (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005).

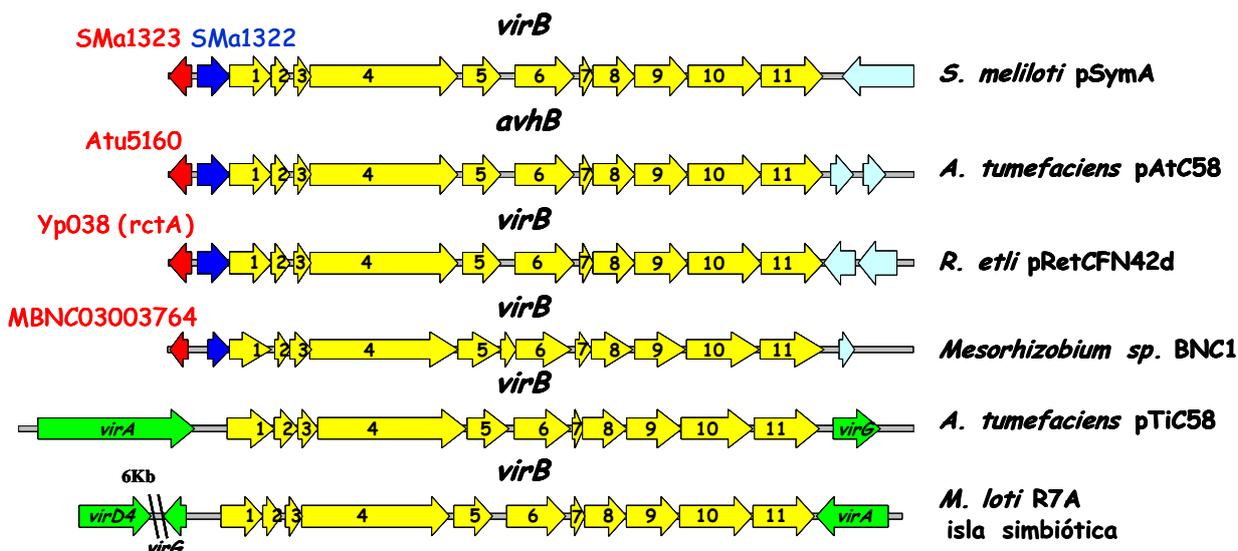


Figura R.II.3. Mapa físico de regiones *virB* de distintas bacterias del orden *Rhizobiales*. Los genes *virB* se muestran en color amarillo. En rojo y azul se detallan genes homólogos a SMA1323 (*rctA*) y SMA1322 respectivamente.

A diferencia de lo que ocurre con los sistemas VirB presentes en el plásmido Ti de *Agrobacterium* y el de *M. loti* R7A, no se han podido identificar genes homólogos a *virA* o *virG* asociados a los operones *virB* del pSymA de *S. meliloti*, del plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens*, del plásmido p42d de *R. etli* o del plásmido 1 de *Mesorhizobium* sp. BNC1. Tampoco ha sido posible la identificación de cajas *vir* (Pazour & Das, 1990) o cajas *nod* (Rostas *et al.*, 1986) asociadas a estos operones *virB*. Todo esto sugiere que el mecanismo de regulación que controla la expresión de estos genes *virB*, con gran probabilidad, difiere del descrito para los sistemas VirB del plásmido Ti de *Agrobacterium* y de *M. loti* R7A.

2.2. Función de la región *virB* de *S. meliloti* en el establecimiento de simbiosis con leguminosas

Al inicio de la caracterización de la región *virB* de *S. meliloti*, de los distintos sistemas homólogos a VirB que se habían descrito presentes en rizobios, sólo se había asociado un papel en simbiosis al de *M. loti* (Hubber *et al.*, 2004). Mutantes *vir* de esta bacteria muestran un comportamiento distinto al de la cepa silvestre, tanto en plantas hospedadoras con las que normalmente *M. loti* establece simbiosis efectivas, como en plantas no hospedadoras. Así, en *Lotus corniculatus*, mutantes *vir* de *M. loti* nodulan más lentamente y son menos competitivos que la cepa silvestre, mientras en *Leucaena*

leucocephala, una planta que no es infectada por *M. loti*, los mutantes *vir* son capaces de inducir nódulos que contienen bacteroides fijadores de nitrógeno.

Para comprobar si la región *virB* de *S. meliloti* desempeña algún papel en el establecimiento de simbiosis con plantas leguminosas, se han adoptado dos estrategias: i) analizar el comportamiento simbiótico de mutantes que carecen de la región *virB*, y ii) analizar el fenotipo simbiótico de mutantes *rctA* en los que la expresión de la región *virB* se halla desregulada.

2.2.1. Fenotipo simbiótico de mutantes *virB* de *S. meliloti*

Para abordar este estudio se han construido mutantes derivados de las cepas GR4 y 1021 de *S. meliloti* en los que casi toda la región *virB* ha sido eliminada. La construcción de estos mutantes se detalla en el Anexo II.1. El fenotipo simbiótico de estos mutantes se ha ensayado tanto en plantas con las que *S. meliloti* establece simbiosis efectiva (*M. sativa* y *M. truncatula*), como en plantas que no son hospedadoras habituales de esta bacteria.

Hemos comprobado que los mutantes *virB* de *S. meliloti* son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de alfalfa y *M. truncatula*. Además, se han realizados experimentos de determinación de la capacidad infectiva (cinéticas de nodulación) y competitiva en plantas de alfalfa, no detectándose diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre (Fig. R.II.4 y R.II.5).

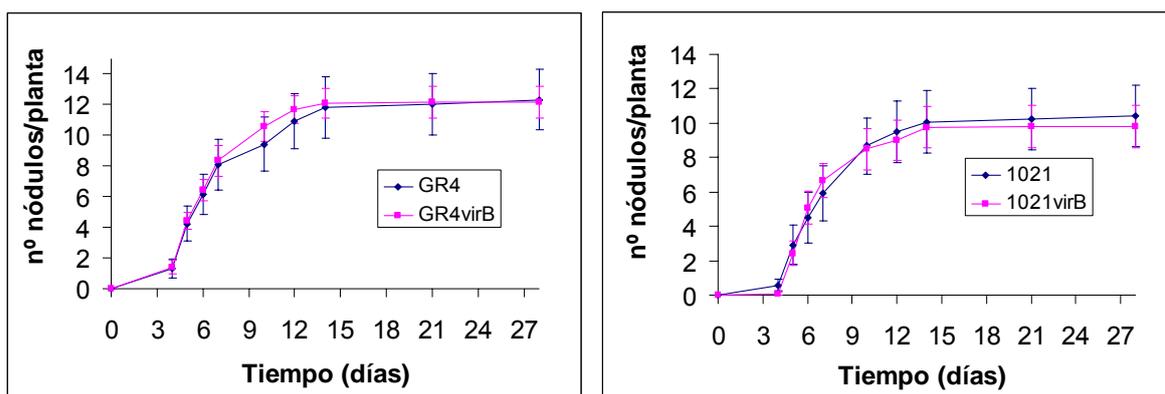


Figura R.II.4. Cinéticas de nodulación de cepas silvestres y mutantes *virB* de *S. meliloti* en plantas de alfalfa. Los datos representan la media y el error estándar de 24 plantas de alfalfa con un intervalo de confianza del 95 %. Ejemplo representativo de al menos dos experimentos.

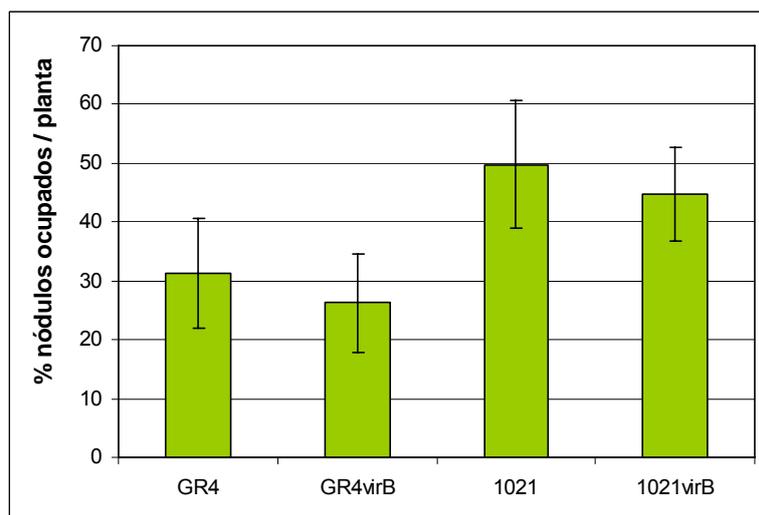


Figura R.II.5. Porcentaje de ocupación de nódulos de GR4, GR4virB, 1021 y 1021virB tras inocular plantas de alfalfa con mezclas 1:1 de GR4xGR4(pGUS3), GR4virBxGR4(pGUS3), 1021x1021(pGUS3) y 1021virBx1021(pGUS3) respectivamente. Los datos representan la media y el error estándar de tres experimentos con 12 plantas.

De igual modo, cinéticas de nodulación realizadas en plantas de *M. truncatula*, revelan que cepa silvestre y mutante *virB* tienen una capacidad infectiva muy parecida (Fig. R.II.6), y en un ensayo de competitividad realizado sólo con las cepas GR4 y GR4virB en plantas de *M. truncatula* crecidas en jarras Leonard, tampoco se observaron diferencias, obteniéndose porcentajes de ocupación de $80,7 \pm 5,4$ y $78,8 \pm 5,4$ para la cepa silvestre y mutante, respectivamente.

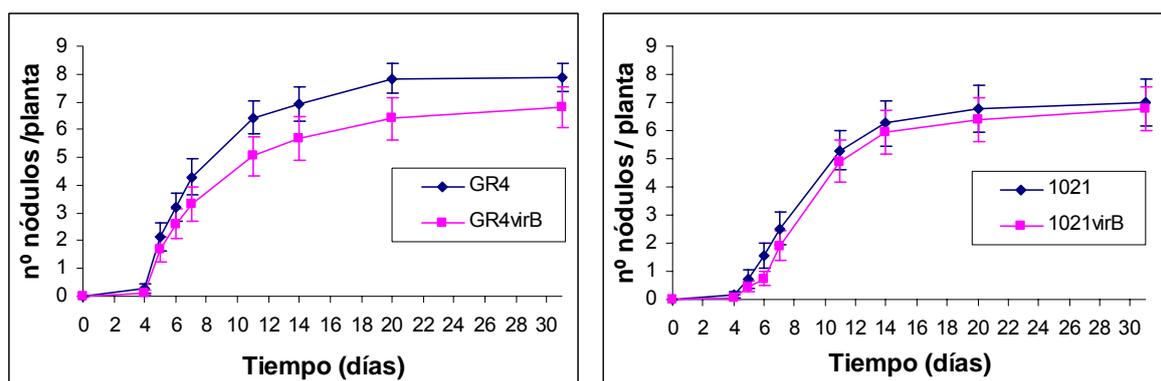


Figura R.II.6. Cinéticas de nodulación de cepas silvestres y mutantes *virB* de *S. meliloti* en plantas de *M. truncatula*. Los datos representan la media y el error estándar de 24 plantas con un intervalo de confianza del 95 %. Ejemplo representativo de al menos dos experimentos.

Para comprobar si la ausencia de la región *virB* pudiera tener un efecto en la interacción que *S. meliloti* establece con leguminosas no hospedadoras, hemos

inoculado plantas de guisante (*Pisum sativum*), siratro (*Macroptilium atropurpureum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), veza (*Vicia sativa*), y judía (*Phaseolus vulgaris*) con los mutantes *virB* y las correspondientes cepas silvestres de las que derivan. Aunque en ningún caso se ha observado un fenotipo llamativo, Fix^+ o Nod^+ , sí que se han puesto de manifiesto ciertas tendencias que pensamos podrían merecer un estudio más exhaustivo en el futuro.

Ni en plantas de guisante ni en siratro hemos observado efecto alguno de la presencia/ausencia de la región *virB* sobre la capacidad de *S. meliloti* para establecer simbiosis con estas leguminosas. En el caso de las plantas de guisante, el fenotipo Fix^- mostrado por la parte aérea y la ausencia de nódulos transcurridas 4 semanas después de la inoculación, reveló la ausencia de algún tipo de interacción simbiótica entre esta leguminosa y las cepas ensayadas.

En el caso de siratro, todas las plantas mostraron un fenotipo Fix^- , aunque hemos de mencionar que se han detectado diferencias entre las cepas GR4 y 1021 en cuanto a la capacidad para inducir estructuras tipo nódulo en las raíces de esta planta. Así, mientras que la inoculación con 1021 y 1021*virB* no tiene ningún efecto en las raíces, GR4 y GR4*virB* indujeron estructuras macroscópicamente muy parecidas a los nódulos inducidos por la cepa utilizada como control *Rhizobium* sp. NGR234, aunque en menor número (Fig. R.II.7A y R.II.8). No hemos analizado si estas estructuras están vacías de bacterias o por el contrario contienen las correspondientes cepas de *S. meliloti*. En cualquier caso, no se han detectado diferencias significativas entre GR4 y mutante *virB* en cuanto a la capacidad de inducir este tipo de estructuras (Fig. R.II.7A).

La inoculación de garbanzo con cada una de las cuatro cepas, da lugar a la aparición en las raíces de esta planta de pequeños abultamientos (Fig. R.II.8), casi todos ellos vacíos, con la excepción de algunos de los inducidos por GR4 de los que sí se pudo aislar bacterias. Hemos comprobado además que, mientras GR4*virB* induce el mismo número de abultamientos que GR4, la ausencia del sistema VirB en el fondo genético de 1021 parece incrementar la capacidad de la bacteria de inducir el desarrollo de este tipo de estructuras en la planta aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (Fig. R.II.7B).

En plantas de veza, al igual que en garbanzo, las cuatro cepas indujeron el desarrollo de abultamientos (Fig. R.II.8). Curiosamente, pudimos aislar bacterias de las estructuras inducidas por los mutantes *virB*, pero no de las inducidas por las cepas silvestres. Además, sin llegar a ser estadísticamente significativas el mutante 1021*virB*

Capítulo II. RESULTADOS

mostró una tendencia a inducir mayor número de abultamientos que 1021 (Fig. R.II.7C). Estos datos parecen sugerir que el sistema VirB de *S. meliloti* interfiere de forma negativa en el proceso de “nodulación” e infección de esta leguminosa.

Por último, hemos analizado el efecto de la región *virB* de *S. meliloti* en la asociación con plantas de judía. Éste ha sido el único caso en el que las cuatro cepas ensayadas indujeron estructuras que al menos macroscópicamente se asemejan a nódulos, si bien éstos eran de menor tamaño que los inducidos por la cepa control *R. etli* CE3, y además blancos (Fix⁻) (Fig. R.II.8). Se ha conseguido reaislar bacterias de los “nódulos” de todas las cepas ensayadas salvo de los inducidos por 1021, pero no se han observado diferencias significativas en la capacidad de inducir nódulos dependiente de *virB*.

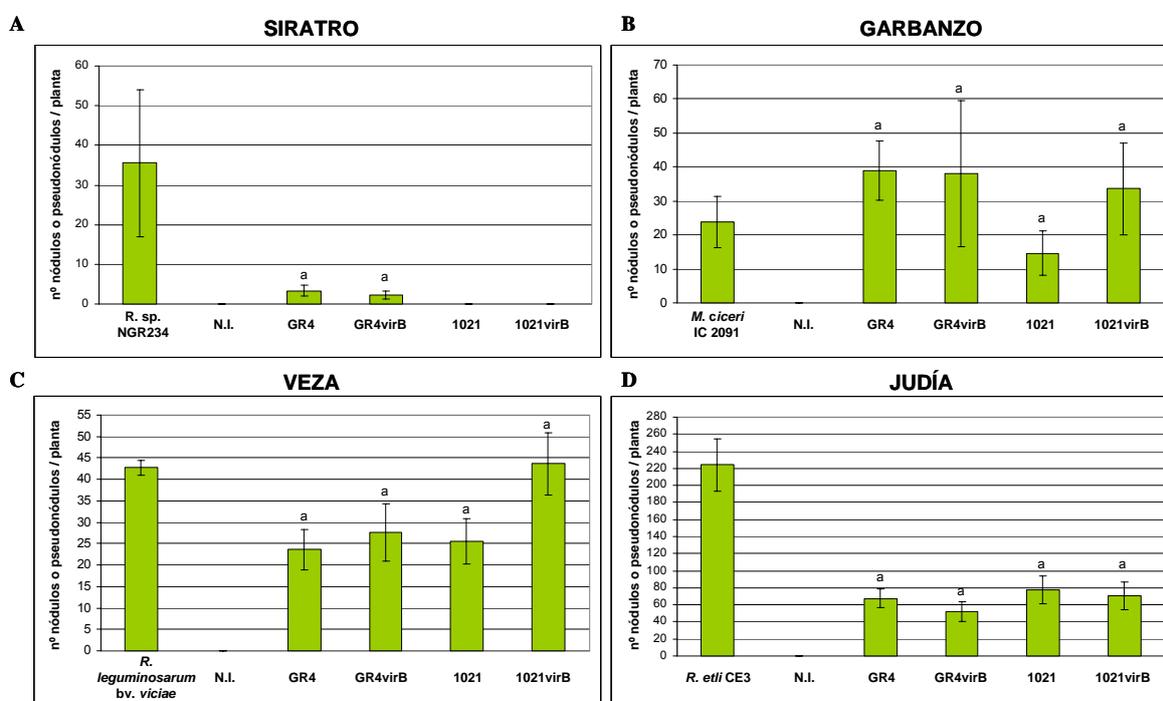


Figura R.II.7. Influencia del sistema VirB en la capacidad de nodulación de cepas de *S. meliloti* en leguminosas no hospedadoras. **A)** Nodulación de siratro. Los datos corresponden a la media y el error estándar obtenidos en 1 único experimento. **B)** Nodulación de garbanzo. Los datos corresponden a la media y el error estándar de 2 experimentos con 4 plantas por tratamiento **C)** Nodulación de veza. Los datos corresponden a la media y el error estándar de cuatro experimentos. **D)** Nodulación de judía. Se representa la media y el error estándar de tres experimentos. En cada experimento se inocularon 4 plantas con cada una de las cepas. N.I., No inoculada

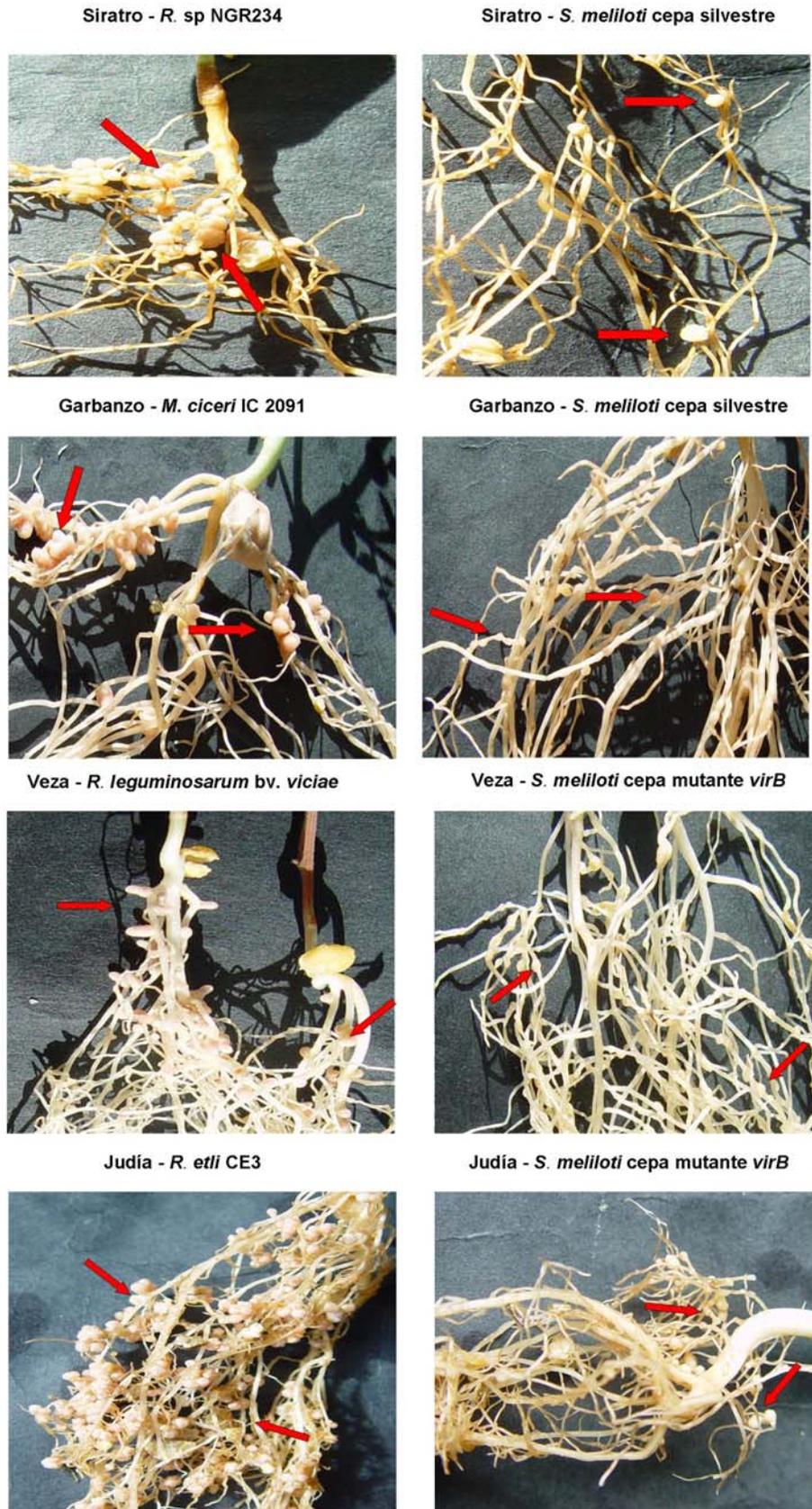


Figura R.II.8. Aspecto de las estructuras (flechas rojas) inducidas por *S. meliloti* en raíces de leguminosas con las que no establece interacción compatible. En la columna de la izquierda aspecto de los nódulos inducidos por la correspondientes cepas control.

En resumen, nuestros datos demuestran que el sistema VirB de *S. meliloti* no es esencial en el establecimiento de simbiosis con leguminosas hospedadoras, confirmando resultados obtenidos por otros autores (Barnett *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2007). No obstante, el hecho de que la presencia/ausencia de este sistema conlleve variaciones en la capacidad infectiva o inductora de pseudonódulos en leguminosas incompatibles, sugiere que VirB podría modular algunas etapas de la interacción planta-bacteria, fenómeno que es dependiente tanto de la leguminosa como de la cepa bacteriana.

2.2.2. Fenotipo simbiótico de mutantes *rctA* de *S. meliloti*

En este trabajo hemos demostrado que el gen SMA1323 (*rctA*) reprime la expresión de la región *virB* (ver apartado 2.4), y que mutantes *rctA* de *S. meliloti* expresan los genes *virB* en condiciones en las que normalmente no se transcriben. Para comprobar si la expresión desregulada de la región *virB* puede afectar la interacción de la bacteria con la leguminosa, se inocularon plantas de alfalfa con los mutantes *rctA* derivados de la cepa GR4 y 1021, los cuales en condiciones de laboratorio muestran una expresión constitutiva de la región *virB*. Estos mutantes *rctA*, al igual que los *virB* han sido capaces de nodular y fijar nitrógeno. Además como se puede apreciar en la Fig. R.II.9 la capacidad infectiva no parece encontrarse alterada de manera significativa.

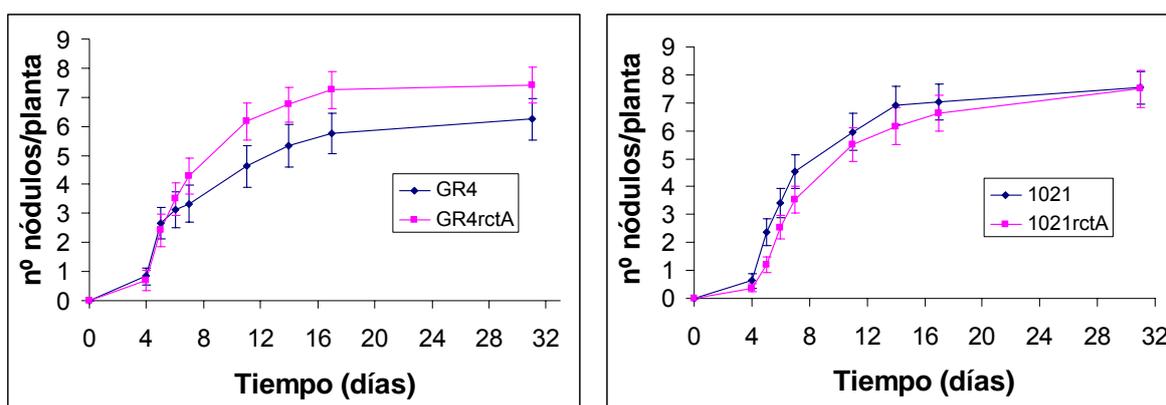


Figura R.II.9. Cinéticas de nodulación de plantas de alfalfa de las cepas silvestre y mutante *rctA* de *S. meliloti*. Los datos representan la media y el error estándar de 24 plantas de alfalfa. Ejemplo representativo de al menos dos experimentos

El fenotipo simbiótico del mutante GR4rctA también se ha ensayado en plantas de *M. truncatula*. En este caso, los experimentos se realizaron en jarras Leonard

determinándose el número de nódulos que tanto la cepa silvestre como mutante son capaces de desarrollar por planta a los 12 y 20 días después de la inoculación (dpi), así como su capacidad competitiva a los 30 dpi. Al igual que ocurrió en alfalfa, el mutante fue capaz de nodular y fijar nitrógeno, no observándose diferencias en el grado de infectividad (Fig. R.II.10). Asimismo el experimento de coinoculación con la cepa GR4 (pGUS3) en proporción 1:1, no reveló diferencias en la capacidad competitiva de la cepa GR4rctA que ocupó un $78,9 \pm 5,5$ % de un total de 202 nódulos, con respecto a la cepa silvestre GR4 que ocupó el $80,7 \pm 5,4$ % de un total de 213 nódulos. Tomados en conjunto estos resultados sugieren que la expresión desregulada del sistema VirB tampoco parece afectar la interacción de *S. meliloti* con sus leguminosas hospedadoras.

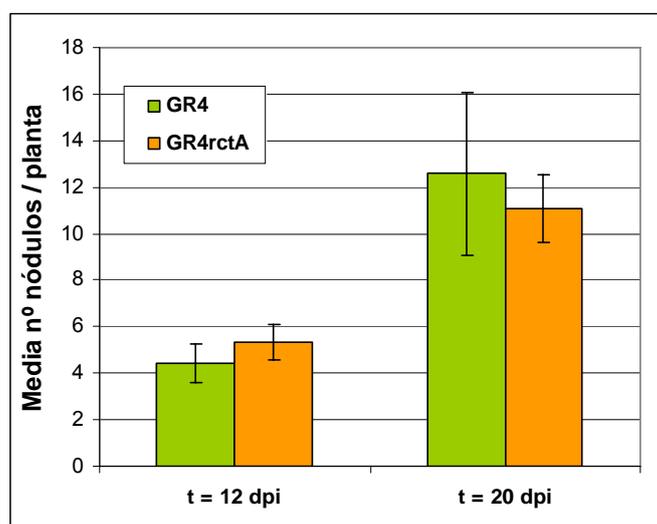


Figura R.II.10. Capacidad infectiva en plantas de *M. truncatula* de cepas silvestre y mutante *rctA* de *S. meliloti* GR4. Los valores representan la media y el error estándar de 12 plantas en 1 único experimento.

2.3. Análisis funcional de la región *virB* de *S. meliloti* como sistema de secreción tipo IV (T4SS)

2.3.1. Complementación del fenotipo avirulento de mutantes *virB* de *A. tumefaciens*

La región *virB* del plásmido Ti de *A. tumefaciens* codifica un T4SS crucial para la virulencia de la bacteria, participando en el transporte del complejo-T cuyo ADN posteriormente transformará a la célula vegetal. Consecuencia de ello, mutantes *virB* de *A. tumefaciens* son incapaces de desarrollar tumores en plantas (Hooykaas *et al.*, 1984). Para investigar si la región *virB* de *S. meliloti* codifica un T4SS, decidimos comprobar

Capítulo II. RESULTADOS

si su presencia en mutantes *virB* de *Agrobacterium*, era capaz de restaurar la virulencia de estas bacterias.

Para disponer de la región *virB* completa de *S. meliloti*, se llevó a cabo el escrutinio de una genoteca de la cepa GR4, utilizando como sonda el inserto del clon pBvirB5 que contiene la secuencia codificante del gen *virB5* de *S. meliloti* (ver Anexo II.2.). De un total de 6.600 colonias analizadas, 18 dieron señal con la sonda utilizada. El análisis del ADN plasmídico de estos clones mediante digestión con *EcoRI* (Fig. R.II.11A), permitió identificar 3 tipos de cósmidos solapantes: dos de ellos que portaban la región *virB* completa de *S. meliloti* (pSmeVIRB1.1, pSmeVIRB2.2) y otro que contenía sólo los genes *virB5-virB11* del sistema (pSmeVIRB1.2). (Fig. R.II.11B y 11C).

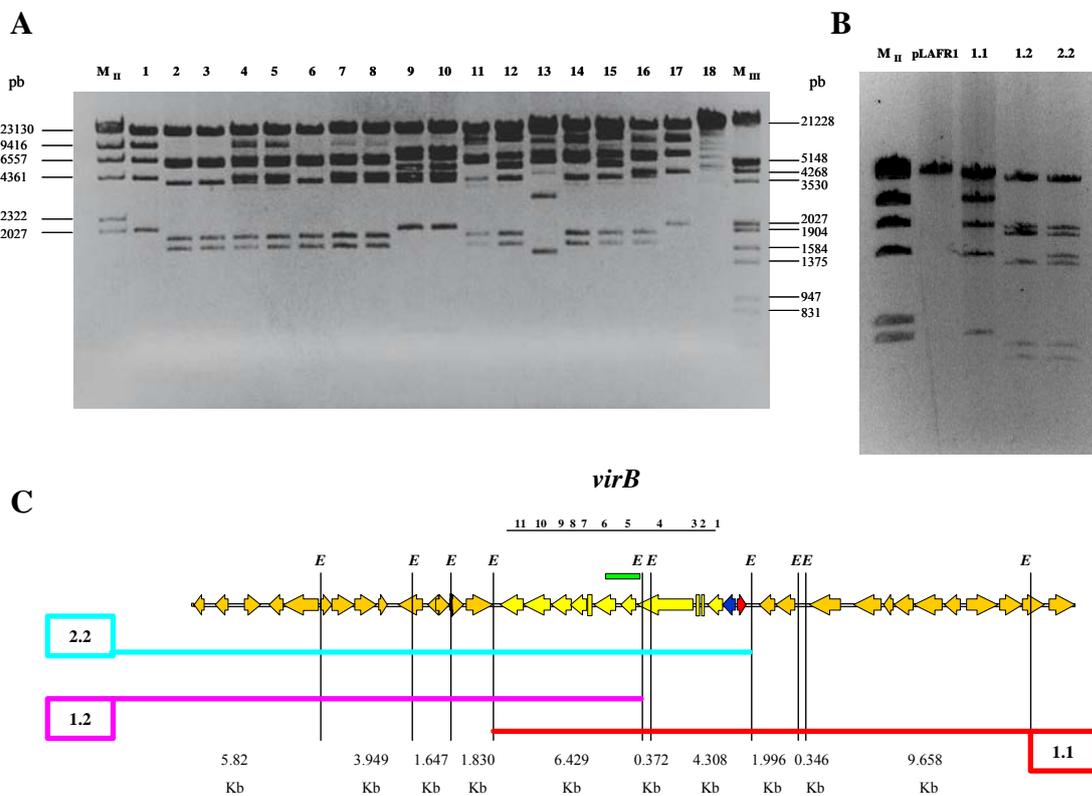


Figura R.II.11. Aislamiento y perfil de restricción de cósmidos que contienen la región *virB* de *S. meliloti*. **A)** Perfil de restricción *EcoRI* de cósmidos que hibridaron con *virB5* de *S. meliloti*. Carriles. **M_{II}**. Marcador de peso molecular λ *HindIII*. **M_{III}**. Marcador de peso molecular λ *EcoRI HindIII*. **1-18**. Distintos cósmidos que contienen al menos el gen *virB5* de *S. meliloti*. **B)** Perfil de restricción *EcoRI* de los 3 tipos de cósmidos derivados de pLAFR1 que contienen toda o parte de la región *virB* de *S. meliloti*. **M**. Marcador de peso molecular λ *Hind III*. **C)** Mapa físico de la región *virB* de *S. meliloti* indicando los sitios de restricción *EcoRI*, y el ADN contenido en cada uno de los cósmidos seleccionados. En verde se detalla el fragmento utilizado como sonda en la hibridación.

Los cósmidos pSmeVIRB1.1 y pSmeVIRB2.2 que contenían la región *virB* completa de *S. meliloti*, así como el cósmido pSmeVIRB1.2 que sólo contiene los genes *virB5-virB11* y el cósmido control pLAFR1, se transfirieron mediante electroporación a los mutantes *virB* de *A. tumefaciens* LBA1512 y LBA1516. Los mutantes *virB* conteniendo o no las distintas construcciones, así como la cepa isogénica *virB*⁺ LBA1010 se usaron como inóculos en ensayos de tumorigénesis en plantas de tomate tal y como se describe en el apartado 4.8 de materiales y métodos. Como se puede apreciar en la Fig. R.II.12, mientras la cepa *virB*⁺ LBA1010 fue capaz de inducir tumores claramente visibles 3 semanas después de la inoculación, en ningún caso, la presencia de los cósmidos que contenían la región *virB* de *S. meliloti* consiguió recuperar la virulencia de los mutantes de *Agrobacterium*.

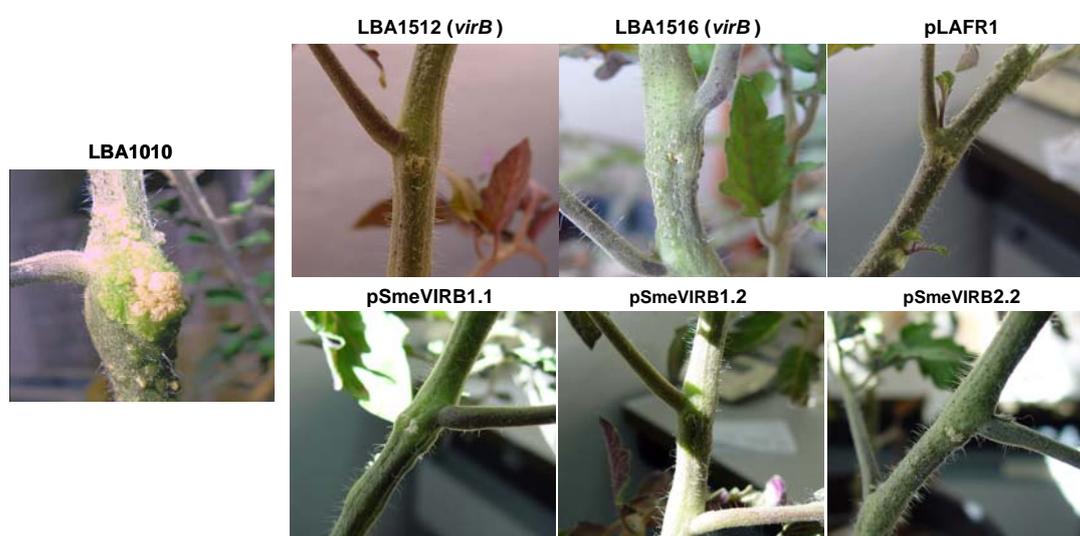


Figura R.II.12. Aparición de tumores en plantas de tomate inoculadas con distintas cepas de *A. tumefaciens*: LBA1010 (*virB*⁺), LBA1512 y LBA1516 (*virB*). Las fotos del fenotipo conferido por la presencia de pLAFR1 y los distintos cósmidos corresponden a LBA1512. El mismo fenotipo se observó en la cepa LBA1516.

El hecho de que la virulencia de mutantes *virB* de *A. tumefaciens* no pueda ser restaurada introduciendo cósmidos portadores de la región *virB* de *S. meliloti*, podría ser explicado por un defecto en expresión. Los cósmidos pSmeVIRB1.1 y pSmeVIRB2.2, además de la región *virB* completa, poseen el gen Sma1323, un homólogo al gen *rctA* de *R. etli* que se sabe que regula la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de esta bacteria, reprimiendo la expresión de genes que codifican funciones de transferencia, entre ellas la del complejo Mpf codificado por los genes *virB*

(Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Además, en el plásmido críptico pAtC58 de *A. tumefaciens*, plásmido que se encuentra presente en los mutantes *virB* utilizados, existe un homólogo a *rctA* (Atu5160) localizado aguas arriba de la región AvhB (ver Fig. R.II.3). La presencia de SMa1323, Atu5160, y/o las condiciones ambientales del ensayo de virulencia, podrían dificultar la expresión de la región *virB* de *S. meliloti* en los mutantes *virB* de *Agrobacterium*. Estudios de expresión han demostrado que la presencia de SMa1323, pero no la de Atu5160, bloquea la expresión de la región *virB* de *S. meliloti* en *A. tumefaciens*. Los resultados de estos estudios aparecen detallados en el apartado 2.4 de este capítulo de resultados.

Aunque se ha intentado obtener una construcción que no contuviera SMa1323, las distintas aproximaciones abordadas (mutagénesis de los cósmidos que contienen la región *virB* o amplificación y posterior clonaje de la región de ADN comprendida entre SMa1322-*virB11*), han sido infructuosas. Una posible explicación podría ser que la sobre-expresión de la región *virB* conferida por la ausencia de SMa1323 junto al alto número de copias de los vectores utilizados, confiera inviabilidad celular.

2.3.2. Papel de la región *virB* de *S. meliloti* en transferencia conjugativa de ADN

Como se ha mencionado en el apartado de antecedentes de este capítulo, una de las subfamilias mayoritarias de T4SS está compuesta por sistemas funcional y ancestralmente relacionados con el sistema de conjugación bacteriano conocido como Mpf (*Mating-pair formation*), un canal proteico transmembrana a través del cual se transloca el ADN desde la célula donadora a la receptora. Un representante de este grupo es el sistema AvhB de *A. tumefaciens*, implicado en la transferencia conjugativa del plásmido críptico pAtC58, así como del plásmido IncQ RSF1010 (Chen *et al.*, 2002).

Varios hechos nos llevaron a pensar que la región *virB* de *S. meliloti* pudiera tener una función en transferencia conjugativa: 1.- La alta homología mostrada con el sistema AvhB de *A. tumefaciens*; 2.- Una mutación en el gen SMa1323 incrementa la expresión de genes Dtr (*DNA transfer and replication*) (*traAI* y *traC*), y promueve la transferencia conjugativa del plásmido pSymA de *S. meliloti* en condiciones de laboratorio (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005), y 3.- La ausencia del gen SMa1323 induce la expresión de los genes *virB* en *S. meliloti* (ver apartado 2.4 de este capítulo).

Para comprobar la implicación del sistema VirB de *S. meliloti* en transferencia conjugativa, se obtuvo un mutante *virB* derivado de la cepa 1021rctA, donde la mayor parte de la región *virB* se eliminó e intercambió por un casete de resistencia a kanamicina (ver Anexo II.1), y se investigó la transferencia tanto del plásmido simbiótico pSymA como de pML122 (un derivado del plásmido RSF1010) en cruces en los que se utilizó la cepa GMI9023 de *A. tumefaciens* como receptor. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla R.II.1.

Tabla R.II.1. Frecuencia de transferencia de pSymA y pML122 desde distintas cepas donadoras^a de *S. meliloti*.

Donador	pSymA	pML122
100tSS ^b	No detectable	No detectable
1021rctA	$2,8 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-6}$
1021rctAvirB	No detectable	No detectable

^a La frecuencia de transferencia se ha calculado como el número de transconjugantes obtenidos ($Sm^R Spc^R$ en el caso de pSymA o Gm^R en el de pML122) dividido por el número total de células donadoras; se muestra la media de tres experimentos independientes.

^b Derivada de 1021 que porta un pSymA marcado (*otsA::SmSpc*) para poder detectar transferencia del plásmido simbiótico.

Como era de esperar, en los cruces en los que la cepa donadora fue 100tSS, no se detectó transferencia de ninguno de los plásmidos. Pudimos comprobar que la ausencia del gen *rctA* promueve la transferencia tanto de pSymA como de pML122, aunque en el caso del plásmido IncQ la frecuencia de transferencia fue un orden de magnitud inferior a la obtenida para el plásmido simbiótico. Esta menor eficiencia de transferencia del plásmido IncQ con respecto a la del plásmido que codifica el sistema VirB, también ha sido observada en *A. tumefaciens* (Chen *et al.*, 2002). La delección de la región *virB* en 1021rctA, anuló completamente la movilización de los dos plásmidos. Estos datos sugieren que el sistema VirB de *S. meliloti* es capaz de funcionar como sistema Mpf en la transferencia conjugativa de al menos pSymA y pML122.

2.4. Estudios de expresión de la región *virB* de *S. meliloti*

Investigaciones previas realizadas en nuestro grupo apuntaban a que muy probablemente la región *virB* de *S. meliloti* podría hallarse bajo el control del gen

SMa1323 (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Este gen que se encuentra aguas arriba de la región *virB*, es un homólogo del gen *rctA* de *R. etli*, un regulador clave en el control de transferencia conjugativa del plásmido simbiótico p42d, que en condiciones de laboratorio actúa disminuyendo la expresión de funciones de transferencia: genes *tra* y *virB*. En ese mismo estudio se comprobó que SMa1323 también es un regulador negativo de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pSymA, siendo capaz de reprimir la expresión de los genes *traA1* y *traC* de *S. meliloti*. Con objeto de comprobar si SMa1323 desempeña algún papel en el control de la expresión de la región *virB* de *S. meliloti*, se construyeron fusiones transcripcionales del gen *virB1* y SMa1322 al gen *lacZ*, fusiones en las que se encontraba o no presente el gen *rctA* (SMa1323) (ver Anexo II.3). Estas fusiones nos han permitido investigar no sólo la influencia de SMa1323, sino también el efecto de condiciones ambientales y fondos genéticos en la expresión de *virB*, así como tener indicios de la pertenencia o no de SMa1322 a la misma unidad transcripcional que los genes *virB1-virB11*.

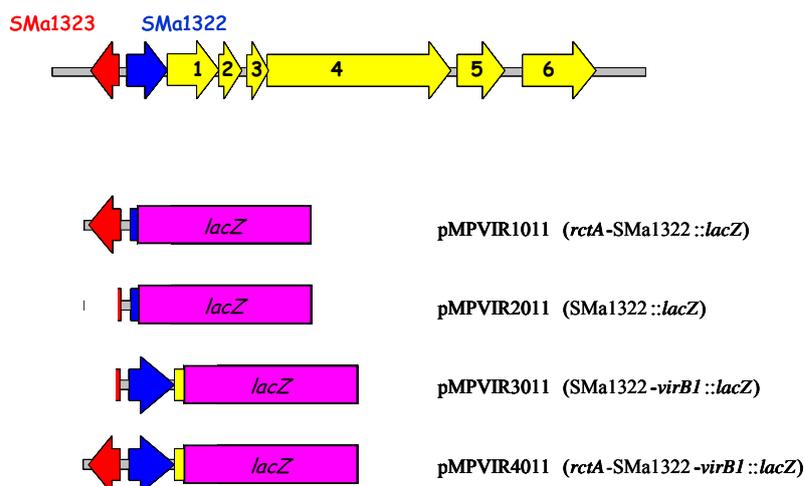


Figura R.II.13. Representación esquemática de fusiones transcripcionales al gen *lacZ* de los genes SMa1322 y *virB1*

2.4.1. Expresión en *S. meliloti*

Las distintas fusiones transcripcionales pMPVIR1011, pMPVIR2011 y pMPVIR3011 se transfirieron a las cepas GR4 y 1021 de *S. meliloti*, así como a sus correspondientes mutantes *rctA*, y se ensayó la actividad β -galactosidasa presente en cultivos en fase exponencial crecidos en medio TY. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla R.II.2.

Tabla R.II.2.-Expresión de Sma1322 y *virB1* en distintas cepas de *S. meliloti*^a.

Fusión transcripcional	1021	1021rctA	GR4	GR4rctA
pMPVIR1011 (<i>rctA</i> -Sma1322:: <i>lacZ</i>)	ND	48 ± 7	51 ± 3	52 ± 2
pMPVIR2011 (Sma1322:: <i>lacZ</i>)	148 ± 2	4545 ± 149	302 ± 10	4803 ± 211
pMPVIR3011 (Sma1322- <i>virB1</i> :: <i>lacZ</i>)	29 ± 5	932 ± 33	61 ± 3	1625 ± 145

^a Los datos corresponden a la media y error estándar de la actividad β-galactosidasa (expresada en Unidades Miller) obtenida en al menos dos experimentos independientes. ND, no determinado.

La presencia del gen *rctA*, bien en el pSymA de la bacteria (cepas 1021 y GR4), bien en la fusión transcripcional (fusión pMPVIR1011), o en ambos, conlleva una disminución de la expresión de Sma1322 y *virB1*. La presencia de *rctA* exclusivamente en la fusión (*cis*) es suficiente para llevar a mínimos los niveles de expresión, mientras la presencia en *trans* del gen en las cepas silvestres (1021 y GR4), permite cierto nivel de transcripción de los genes ensayados, efecto que podría ser explicado por diferencias entre el número de copias del regulador y las secuencias que han de ser reguladas. Estos datos demuestran que, al igual que en *R. etli*, en condiciones de laboratorio, el gen *rctA* de *S. meliloti* es un represor (directo o indirecto) de la región *virB*, y sugiere la idea de que Sma1322 forma parte del operón *virB*.

Hemos confirmado que efectivamente Sma1322 se transcribe junto con el gen *virB1*, llevando a cabo reacciones de RT-PCR utilizando ARN total aislado de células de 1021, así como de la cepa 1021rctA crecidas en medio TY, y los cebadores RT-Sma1322-F y VirB1-R diseñados para que amplifiquen una región de 501 bp que se extiende desde el extremo 3' de Sma1322 hasta el inicio de *virB1* (Fig. R.II.14A).

Como se puede apreciar en la Fig. R.II.14B, fue posible detectar amplificado cuando se utilizó como molde el ADNc obtenido de la cepa 1021rctA, demostrando la existencia de un transcrito que alberga al menos los genes Sma1322 y *virB1*. Este resultado además confirma los datos obtenidos con las fusiones transcripcionales, demostrándose que en una cepa silvestre de *S. meliloti* y en las condiciones de laboratorio ensayadas la expresión de la región *virB* es mínima o inexistente, consecuencia del efecto represor ejercido por RctA.

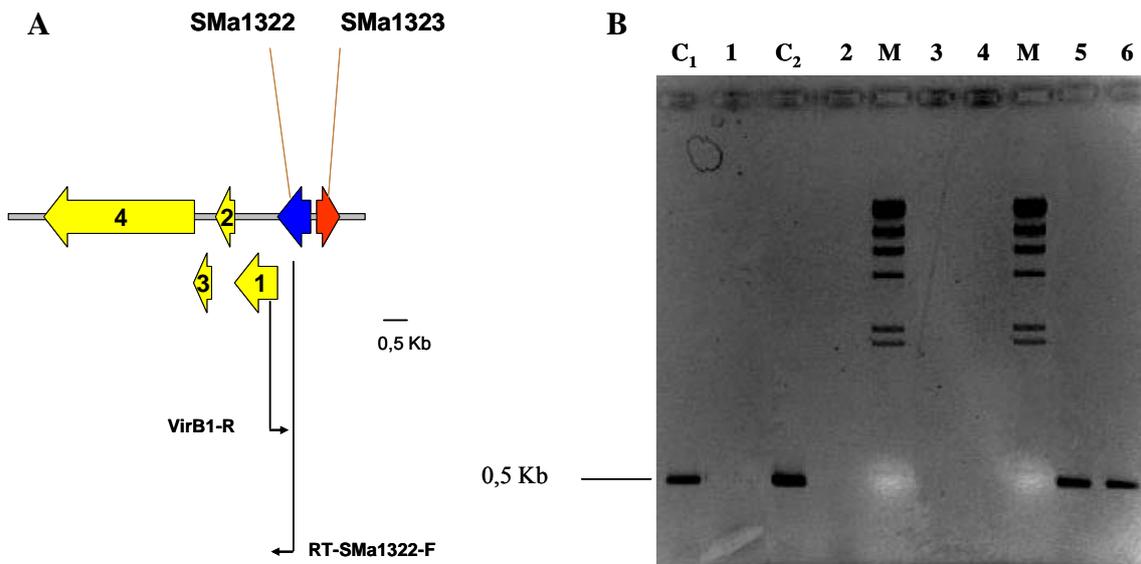


Figura R.II.14. A) Organización de la región *virB* de *S. meliloti*, mostrando el fragmento amplificado en las reacciones de RT-PCR. B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores RT-SMa1322-F y VirB1-R. Carriles: C₁-C₂ Controles positivos en los que se usó ADN genómico de 1021 (C₁) y 1021rctA (C₂), como ADN molde; 1-2. Controles negativos (- RT) usando como molde ARN de 1021 (1) y 1021rctA (2); 3-4, .2 µl - 0,2 µl de la RT-PCR de 1021; 5-6. 2 µl - 0,2 µl de la RT-PCR de 1021rctA.

Se ha propuesto la hipótesis de que determinadas condiciones ambientales, aún desconocidas, deben liberar la represión ejercida por RctA sobre genes que codifican funciones de transferencia (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005), y por tanto también sobre la región *virB*. Hemos investigado la influencia que pueden tener el medio de cultivo, así como compuestos procedentes de la planta, sobre la regulación de los genes *virB*, analizando la expresión de la fusión pMPVIR1011 en los mutantes *rctA* de *S. meliloti*. Como se puede apreciar en la Tabla R.II.3., ni el crecimiento en un medio pobre en nutrientes (MM), ni la adición de luteolina, inductor de los genes *nod* en *S. meliloti*, consiguen liberar el efecto represor de RctA. No podemos descartar sin embargo que estas condiciones ambientales ejerzan un papel regulador, una vez liberada la represión por RctA.

Tabla R.II.3.-Influencia del medio de crecimiento y de luteolina en la expresión de la fusión pMPVIR1011^a.

	TY	TY + luteolina	MM	MM + luteolina
GR4rctA	52 ± 2	58 ± 3	41 ± 4	52 ± 3
1021rctA	48 ± 7	52 ± 6	37 ± 2	49 ± 2

^a Los datos corresponden a la media y error estándar de la actividad β-galactosidasa (expresada en unidades Miller) obtenida en al menos dos experimentos independientes. La luteolina se añadió a una concentración final de 5 μM.

2.4.2. Expresión en *Agrobacterium*

Como se ha descrito en el apartado 2.3.1., la presencia de cósmidos que contienen la región *virB* completa de *S. meliloti*, no es capaz de restaurar la virulencia de mutantes *virB* de *A. tumefaciens*. Este resultado negativo podría ser explicado por un defecto en expresión consecuencia de la presencia del gen SMA1323 en los cósmidos utilizados, del homólogo a *rctA* (Atu5160) del plásmido críptico pAtC58 presente en los mutantes de *A. tumefaciens*, de las condiciones particulares del ensayo de virulencia, o cualquier combinación de estas circunstancias. Para estudiar esta posibilidad, las fusiones transcripcionales *virB1::lacZ* conteniendo o no el gen *rctA* se han transferido a las cepas LBA1512 y GMI9023 de *A. tumefaciens*, siendo la primera uno de los mutantes *virB* utilizados en los ensayos de complementación que contiene pTi y pAtC58, y la segunda una cepa carente de plásmidos (pTi y pAtC58). Los ensayos de expresión se realizaron creciendo las células en dos condiciones distintas: medio rico LB y en medio mínimo de inducción (IM) para *Agrobacterium*, éste último asemejando las condiciones del ensayo de virulencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla R.II.4.

Comparando los datos obtenidos con la fusión pMPVIR4011 con los de pMPVIR3011 en las dos cepas de *Agrobacterium*, se deduce que la presencia de SMA1323 (*rctA*) bloquea la expresión de la región *virB* de *S. meliloti* en *A. tumefaciens*. Por el contrario, la presencia de Atu5160 no tiene efecto negativo en la expresión de la región *virB*, ya que en ausencia de SMA1323, la expresión de la región *virB* es incluso ligeramente superior en el fondo de LBA1512. Aunque no con un efecto tan dramático como *SMA1323*, las condiciones particulares del medio IM también tienen un efecto negativo sobre la expresión de la región *virB* de *S. meliloti*, disminuyendo 3,8 y 2,6

veces los valores observados en LB para las cepas LBA1512 y GMI9023, respectivamente.

Tabla R.II.4. Expresión de *virB1* de *S. meliloti* en cepas de *Agrobacterium*.

Fusión transcripcional	LB		IM	
	LBA1512	GMI9023	LBA1512	GMI9023
pMPVIR3011 (SMa1322-<i>virB1::lacZ</i>)	2811 ± 64	1799 ± 26	730 ± 27	676 ± 1
pMPVIR4011 (<i>rctA</i>-SMa1322-<i>virB1::lacZ</i>)	50 ± 2	26 ± 2	19 ± 3	17 ± 1

^a Los datos corresponden a la media y error estándar de la actividad β-galactosidasa (expresada en unidades Miller) obtenida en al menos dos experimentos independientes.

2.5. Identificación de hipotéticas proteínas secretadas por el sistema VirB de *S. meliloti*

Tal y como se ha mencionado en el apartado 1 de antecedentes de este capítulo, la naturaleza de la mayoría de productos secretados por los T4SS son proteínas. En paralelo con los estudio de expresión, y con objeto de poder identificar posibles sustratos del sistema VirB de *S. meliloti*, decidimos comparar el perfil de proteínas presentes en los sobrenadantes de las cepas silvestres, mutantes *virB* y mutantes *rctA* de GR4 y 1021 de *S. meliloti* crecidas en medio rico TY. Para ello, seguimos un protocolo utilizado en la identificación de efectores de *Salmonella* secretados por un T3SS (Ellermeier & Slauch, 2003), en el que las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos libres de células, se precipitan con ácido tricloroacético y se resuelven posteriormente en electroforesis en geles de poliacrilamida.

En estas condiciones, las subunidades de flagelina (fundamentalmente FlaA y FlaB) de *S. meliloti* son proteínas mayoritarias que dificultan la detección de proteínas que migran entre los 35 y 45 kDa (Fig. R.II.15A). El resto del perfil de proteínas obtenido no han mostrado diferencias asociadas a la presencia del sistema *virB*. Existe la posibilidad de que hipotéticas proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo IV pudieran estar siendo secretadas por otro sistema de secreción diferente en los mutantes *virB*. De hecho, en *Rhizobium* se ha descrito que los T3SS y T4SS podrían ser funcionalmente intercambiables (Hubber *et al.*, 2004). Sin embargo, en *S. meliloti* no se han puesto de manifiesto la presencia de genes *hrc* pertenecientes a un T3SS tal y como se describe más en detalle en el apartado de discusión de este capítulo. Una posibilidad

es que los productos de secreción tipo IV en los mutantes *virB* pudieran ser exportados a través del aparato de secreción flagelar, ancestralmente relacionado con el T3SS que sí está presente en esta bacteria. Para abordar esta posibilidad y al mismo tiempo poder analizar con más definición la región entre 35 y 45 KDa enmascarada por el exceso de flagelina, decidimos analizar el patrón de mutantes carentes del sistema de secreción flagelar. En colaboración con el grupo de la Dra. Birgit Scharf (Regensburg, Alemania), decidimos obtener mutantes *fliF* (defectivos en secreción de flagelina, aflagelados y no móviles) creando los correspondientes mutantes simples *fliF* y dobles mutantes *fliFvirB* sólo en la cepa 1021 de *S. meliloti* puesto que en la cepa GR4 se observó el mismo comportamiento (ver Anexo II). En las condiciones experimentales ensayadas, no hemos podido detectar ningún producto cuya secreción sea dependiente del sistema VirB (Fig. R.II.15B).

Dado que en el caso de *M. loti* la expresión del T4SS así como la secreción de proteínas está íntimamente ligada al reconocimiento de señales de la planta, entre la que se han señalado a flavonoides específicos (Hubber *et al.*, 2007), se decidió llevar a cabo el estudio de secreción de las cepas anteriores en presencia o ausencia de luteolina como inductor de los genes *nod* de *S. meliloti*. Los resultados obtenidos no han permitido detectar diferencias apreciables. Estos resultados no son sorprendentes puesto que sabemos que en las condiciones experimentales utilizadas, la expresión de los genes *virB* es baja o inexistente.

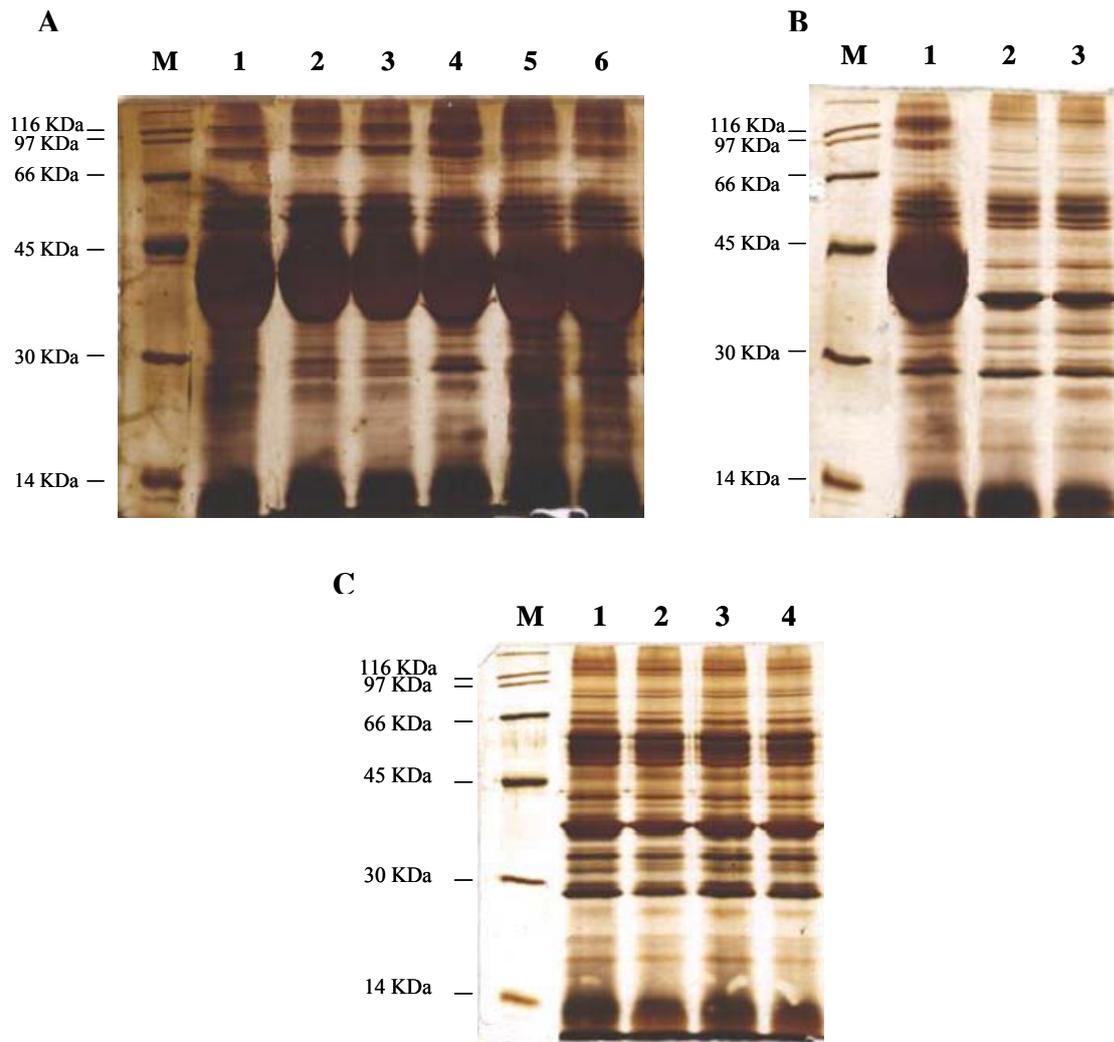


Figura R.II.15. Proteínas secretadas al medio de cultivo líquido TY por *S. meliloti*. Tras precipitación de las proteínas de los sobrenadantes cantidades equivalentes de cada muestra se separan en SDS-12,5% PAGE. Los geles se tiñeron con nitrato de plata. **A)** Perfil de secreción de distintas cepas en ausencia y presencia de la región *virB* de *S. meliloti*. Carriles: **M.** Marcador de proteínas; **1.** GR4; **2.** GR4virB; **3.** GR4rctA; **4.** 1021 **5.** 1021virB; **6.** 1021rctA; **B)** Efecto en secreción causado por la mutación *fliF*. Carriles: **M.** Marcador de proteínas; **1.** 1021; **2.** 1021fliF; **3.** 1021fliFvirB. **C)** Efecto de la luteolina y de la ausencia del sistema *virB*. Carriles: **M.** Marcador de proteínas de amplio rango de peso molecular. **1.** 1021fliF; **2.** 1021fliF + luteolina 5 μ M; **3.** 1021fliFvirB; **4.** 1021fliFvirB + luteolina 5 μ M;

CAPÍTULO II: ANEXO

Anexo II.1.-CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES EN EL SISTEMA VirB DE *S. meliloti*

Se han obtenido mutantes en las cepas GR4 y 1021 de *S. meliloti* en los que casi toda la región *virB* ha sido eliminada (delección de 8919 pb) y sustituida o por un casete de resistencia a Sm y Spc (en el caso de los mutantes simples *virB*), o por un casete de resistencia a kanamicina (en el caso del mutante doble 1021rctAvirB). La estrategia llevada a cabo para conseguir la versión delecionada del sistema VirB se representa de forma esquemática en la Figura A.II.1.

A partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* y utilizando los cebadores Vir1 y Vir2 cuya secuencia se indica más abajo, se amplificó un fragmento de 960 pb correspondiente al extremo 5' de la región *virB* que incluye íntegro al gen SMA1323 y el inicio del gen SMA1322. Aprovechando las dianas existentes en los cebadores, el producto amplificado se digirió con *EcoRI* y *HindIII*, y se clonó en el vector pBluescript II KS obteniéndose la construcción pBVIR2.

Vir1: 5' - TTAGAATTCAGTGCAGACGAAATCATTGC-3'
EcoRI
Vir2: 5' - TTAAAAGCTTGTCTCGAGATGCAACTAGCCTC-3'
HindIII

Paralelamente, utilizando los cebadores Vir3 y Vir4 y ADN genómico de *S. meliloti* 1021, se amplificó un fragmento de 1130 pb correspondiente al extremo 3' de la región *virB*, que incluye una gran parte del gen *virB11*. En este caso, el fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy, obteniéndose el plásmido pGVIR4.

Vir3: 5' - TTAAAAGCTTCTACGAAGTGATCGTAAACC-3'
HindIII
Vir4: 5' - TTAGGATCCGCCTTGAGTCTGCGATCTTA-3'
BamHI

El amplificado clonado en pGVIR4 se aisló tras someter al plásmido a una digestión con las enzimas *HindIII* y *SalI* y se clonó en pBVIR2 previamente digerido con *HindIII* y *XhoI*, generándose así la construcción pBVIR200. Los plásmidos pBVIR300 y pBVIR500 se obtuvieron tras clonar en el único sitio *HindIII* de pBVIR200, el casete de resistencia a estreptomicina/espectinomicina o el de resistencia

a kanamicina, respectivamente, previamente aislados de sus correspondientes plásmidos pHP45 Ω mediante digestión *Hind*III.

Finalmente, para facilitar el intercambio de la región *virB* silvestre por la versión mutada, los insertos de 4,09 Kb de pBVIR300 y pBVIR500 se aislaron mediante digestión *Eco*RI-*Bam*HI y se clonaron en el vector suicida pK18*mobsacB* previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, dando lugar a las construcciones pKVIR400 y pKVIR600, respectivamente. La construcción pKVIR400 se movilizó a las cepas GR4 y 1021, obteniéndose tras la selección los mutantes GR4*virB* y 1021*virB*. Al tratarse de un plásmido suicida, pKVIR400 no puede replicarse en el fondo de *S. meliloti*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes en los que se ha producido el intercambio alélico, ya que son capaces de crecer en medio con sacarosa, son resistentes a Sm y Spc, y sensibles a Km. De forma análoga, la construcción pKVIR600 se movilizó a las cepas GR4*rctA* y 1021*rctA*, obteniéndose tras la selección los mutantes GR4*rctA**virB* y 1021*rctA**virB*, en este caso resistentes a Sm, Spc y Km.

En la Figura A.II.2 se muestra un esquema de la región *virB* de *S. meliloti* y de la mutación resultante. La mutación se verificó en al menos 4 transconjugantes de cada tipo mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Xho*I, y utilizando como sonda el fragmento *Eco*RI de 1130 pb de la construcción pGVIR4, previamente aislado y marcado con digoxigenina. Con esta estrategia, en las cepas que contienen una región *virB* intacta se detecta un fragmento de 13,95 Kb, mientras que en aquéllas que contienen la versión mutada de la región *virB*, el fragmento *Xho*I detectado por la sonda tiene un tamaño de 7,09 Kb (Fig. A.II.3).

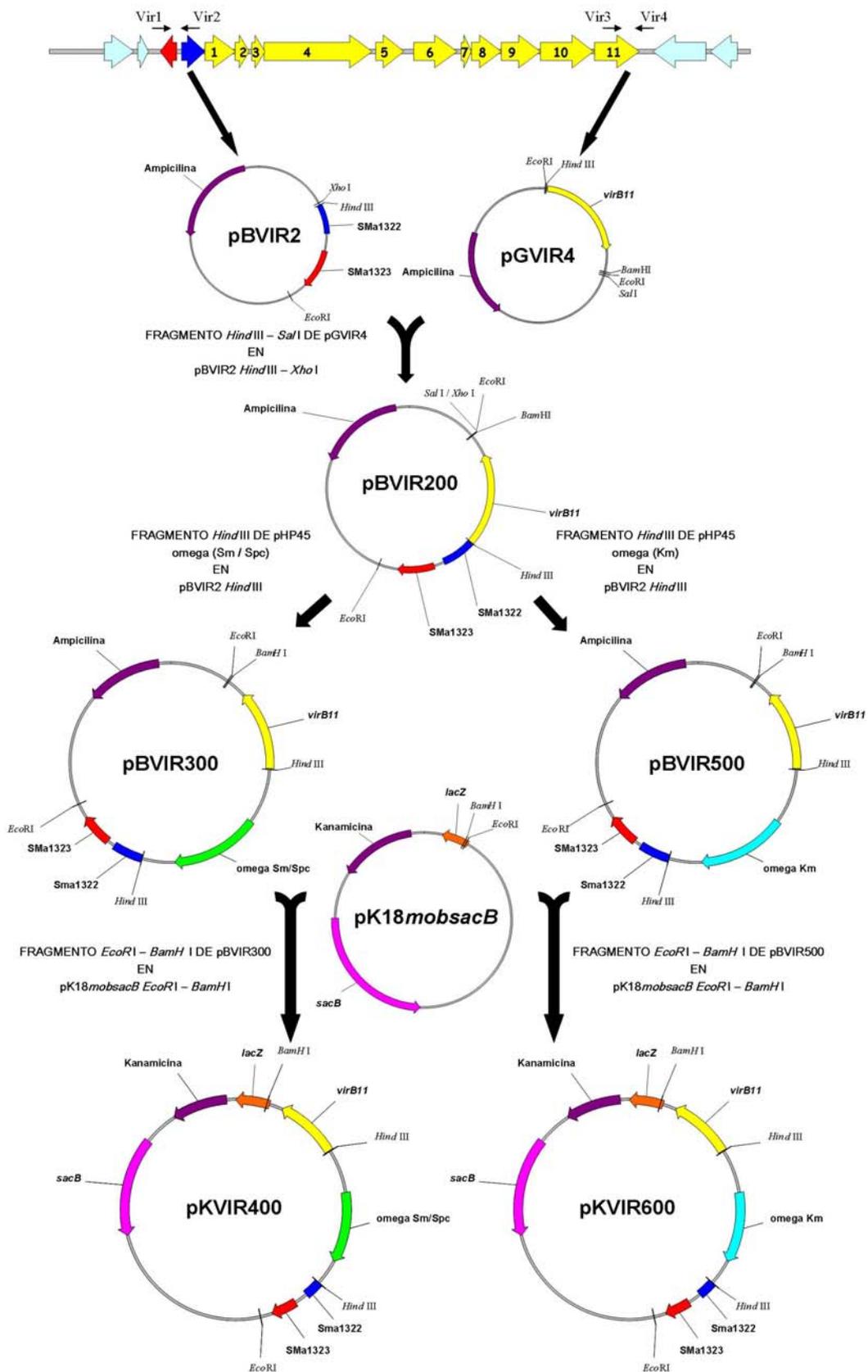


Figura A.II.1. Estrategia de obtención de las construcciones pKVIR400 y pKVIR600.

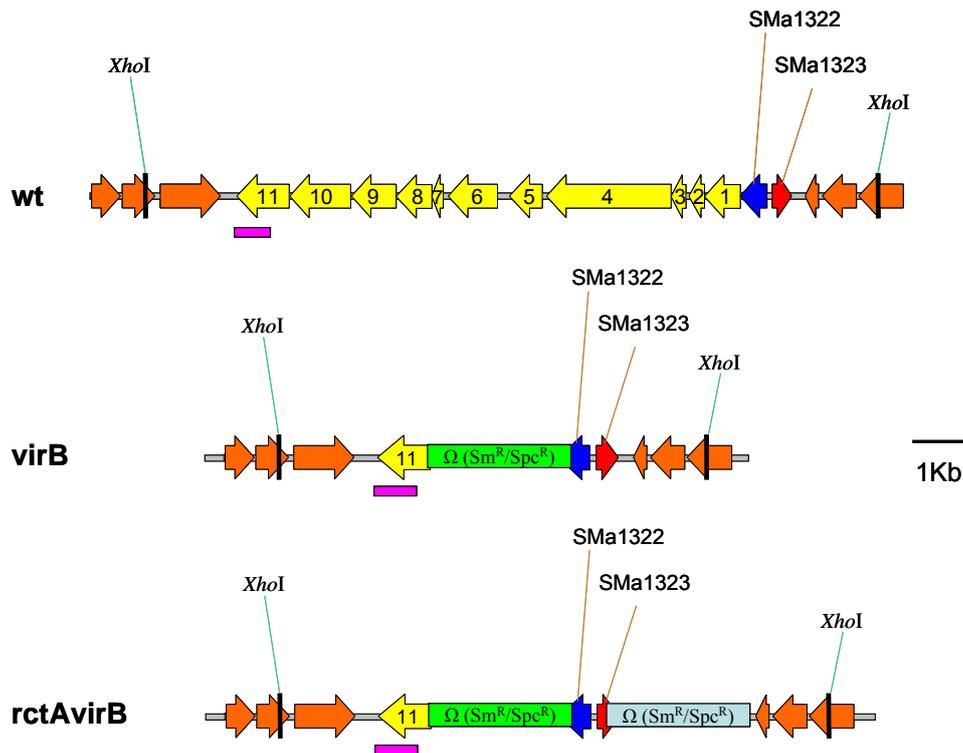


Figura A.II.2. Representación esquemática de la construcción de mutantes simples *virB* y dobles mutantes *rctAvirB* de *S. meliloti* mediante delección e inserción de un casete de resistencia a antibióticos. En amarillo se muestran los genes *virB*. La barra de color rosa representa el fragmento utilizado como sonda en las hibridaciones de comprobación de los mutantes.

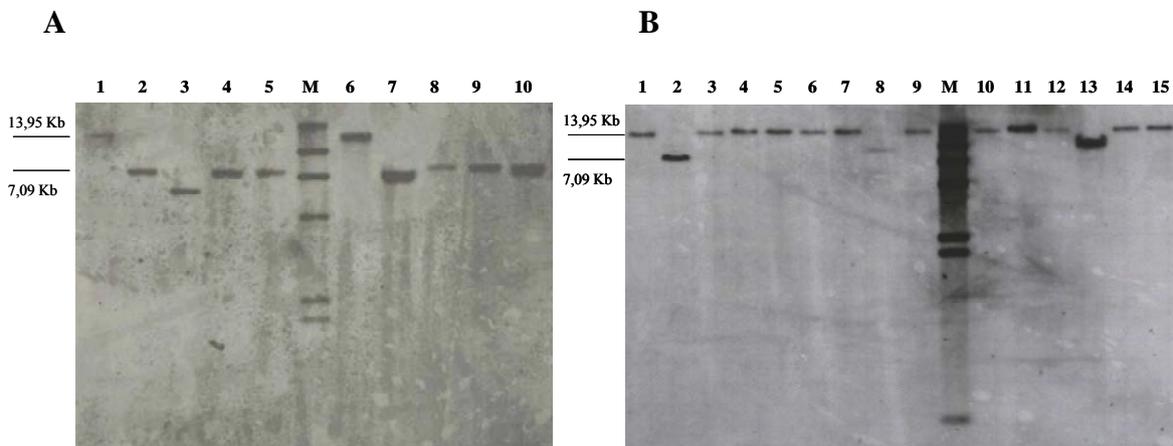


Figura A.II.3. Hibridación de ADN total digerido con *XhoI* de cepas silvestres y mutantes *virB* de *S. meliloti*, utilizando como sonda el inserto *EcoRI* de pGVIR4.

A) Identificación de mutantes *virB* de las cepas GR4 y 1021; Carriles: **1**. GR4; **2, 4, y 5**. Mutantes *virB* derivados de GR4; **3**. Transconjugantes derivados de GR4 que no muestran patrón esperado para un mutante *virB*; **M**. Marcador de peso molecular; **6**. 1021; **7-10**. Mutantes *virB* derivados de 1021.

B) Identificación de dobles mutantes *rctAvirB* de la cepa 1021. Carriles: **1, 3-15**. Transconjugantes derivados de 1021 que no muestran patrón esperado para un mutante *rctAvirB*; **2**. Mutante *rctAvirB* derivado de 1021.

Anexo II.2.-CONSTRUCCIÓN DE pBvirB5

A partir de ADN genómico de la cepa 1021 de *S. meliloti* y utilizando los cebadores VirB5-F y VirB5-R cuya secuencia se indica más abajo, se amplificó un fragmento de 1187 pb conteniendo la secuencia codificante del gen *virB5* y unas 240 pb del extremo 5' de *virB6*.

VirB5-F: 5'-AGAAGGAGTGCGACCTGATG-3'

VirB5-R: 5'-GTTCTTCACCAGCATGACGA-3'

El producto amplificado se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, liberándose un fragmento de 1,062 Kb que se clonó en el vector pBluescript II KS previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose así la construcción pBvirB5.

Anexo II.3.-CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES DE GENES DE LA REGIÓN *virB* DE *S. meliloti*

II.3.1. Construcción de fusiones transcripcionales SMA1322::*lacZ*

Se han obtenido dos fusiones transcripcionales SMA1322::*lacZ*, cuya principal diferencia es la presencia o ausencia del gen *rctA* (SMA1323) de *S. meliloti*, a las que hemos denominado pMPVIR1011 y pMPVIR2011, respectivamente (Fig. A.II.4).

Para obtener la construcción pMPVIR1011, se partió del plásmido pBVIR2 cuya construcción se describe en el anexo A.II.1. De este plásmido, se aisló un fragmento *Eco*RI-*Pst*I de 664 pb conteniendo íntegro el gen *rctA* así como los primeros 37 nucleótidos del gen SMA1322, y se clonó en el vector pMP220 previamente digerido con las enzimas *Eco*RI y *Pst*I.

Para obtener el plásmido pMPVIR2011, se amplificó un fragmento de 378 pb utilizando ADN total de *S. meliloti* 1021 y los cebadores SmvirB1 y SmvirB2.

SmvirB1: 5' - TCTAGA GTCGACACAGGATAACCTGGCAT-3'
 Xba I *Sal* I

SmvirB2: 5' - GAATTCAGCGTTAGCTTTTCGTGAC-3'
 *Eco*RI

El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy obteniéndose el plásmido pGVIR2. Partiendo de este plásmido, y haciendo uso de las dianas de restricción *XbaI* y *EcoRI* presentes en los cebadores utilizados, se aisló el inserto y se clonó en el vector pMP220 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

II.3.2. Construcción de fusiones transcripcionales *virB1::lacZ*

De manera análoga a las fusiones al gen SMA1322, se han obtenido dos fusiones transcripcionales *virB1::lacZ*, cuya principal diferencia es la presencia o ausencia del gen *rctA* (SMA1323) de *S. meliloti*, a las que hemos denominado pMPVIR4011 y pMPVIR3011, respectivamente (Fig. A.II.4).

Para obtener el plásmido pMPVIR3011, se amplificó un fragmento de 872 pb utilizando ADN genómico de *S. meliloti* 1021 y los cebadores SmvirB2 cuya secuencia se ha descrito en el anexo A.II.3.1, y SmvirB1-F de secuencia:

SmvirB1-F: 5' - TCTAGATTCAAGGCTGACGACACC - 3'
XbaI

El fragmento amplificado que contiene el gen *rctA* truncado, el gen SMA1322 completo y 84 nucleótidos del gen *virB1* se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar a la construcción pGVIR3. Desde ésta, y haciendo uso de las dianas de restricción presentes en los cebadores utilizados, se aisló el inserto y se clonó en el vector pMP220 previamente digerido con las enzimas *XbaI* y *EcoRI*.

Para obtener el plásmido pMPVIR4011, se amplificó un fragmento de 1237 pb, utilizando ADN genómico de *S. meliloti* 1021 y los cebadores SmvirB1-F y Vir1, cuyas secuencias se han descrito previamente en este Anexo II. El fragmento amplificado que incluye el gen *rctA* completo, se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy, generándose la construcción pGVIR5. Desde ésta, haciendo uso de las dianas de restricción presentes en los cebadores utilizados, se aisló el inserto y se clonó en el vector pMP220 previamente digerido con las enzimas *XbaI* y *EcoRI*.

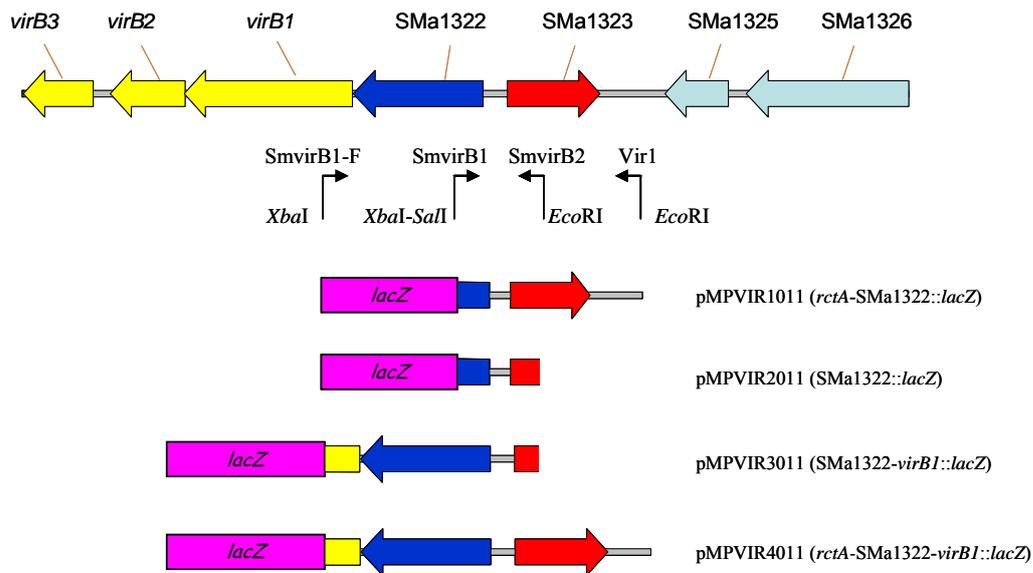


Figura A.II.4. Esquema de construcción de las fusiones transcripcionales pMPVIR1011, pMPVIR2011, pMPVIR3011 y pMPVIR4011.

Anexo II.4.-CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES *fliF* Y *virBfliF* DE *S. meliloti*

Para la construcción de mutantes *fliF* de *S. meliloti* que facilitaran el análisis de proteínas presentes en sobrenadantes de cultivos, se utilizó la construcción pRU2311 cedida por B. Scharf (Regensburg, Alemania). El plásmido pRU2311 es un derivado de pK18*mobsacB* en el que se ha clonado una versión delecionada del gen *fliF* de *S. meliloti*. La deleción que afecta a 1,4 Kb de ADN sólo deja los nucleótidos correspondientes a los primeros 16 aas y últimos 77 aas de la teórica proteína FliF. La construcción se movilizó a las cepas 1021 y 1021*virB* de *S. meliloti*, seleccionándose colonias Km^R en las que se ha debido producir un evento de cointegración. A partir de estas colonias, y tras 48 horas de crecimiento en medio sin antibiótico, se seleccionaron colonias Sac^R Km^S, en las que podría haberse producido el intercambio alélico. La presencia de la mutación se verificó mediante hibridación del ADN genómico digerido con *HindIII*, y utilizando como sonda un fragmento de 1,9 Kb que contiene el gen *fliF*, marcado con digoxigenina (Fig. A.II.5). El ADN utilizado como sonda se obtuvo por PCR usando ADN genómico de 1021 y los cebadores *fliF* y *fliFR* de secuencia:

fliFF: 5'-GGCTGGACAACAAGAGATAT-3'

fliFR: 5'-CTCTTCGCTGATCTCGACCA-3'

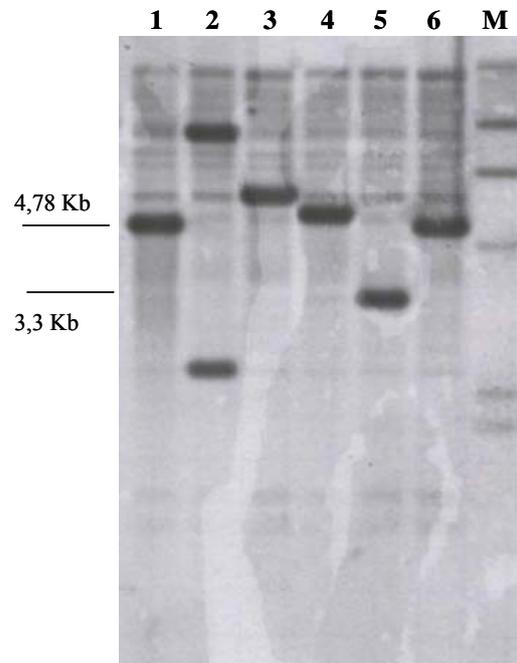


Figura A.II.5. Identificación de mutantes *fliF* de de la cepa 1021virB de *S. meliloti* mediante hibridación de ADN total digerido con *Hind*III utilizando como sonda un fragmento de 1,9 Kb que contiene el gen *fliF*, marcado con digoxigenina. Carriles: **1.** 1021virB; **5.** Mutante *fliFvirB* derivado de 1021virB; **2, 3, 4 y 6.** Transconjugantes derivados de 1021virB que no muestran patrón esperado para un mutante *fliFvirB*; **M.** Marcador de peso molecular.

CAPÍTULO II: DISCUSIÓN

En este trabajo hemos llevado a cabo la caracterización de una región del plásmido simbiótico pSymA de *S. meliloti* que contiene 11 genes que han sido anotados como *virB1-virB11* en virtud a la homología mostrada con los genes *virB* del plásmido Ti de *A. tumefaciens* (Galibert *et al.*, 2001; Barnett *et al.*, 2001). En *Agrobacterium*, los genes *virB* codifican un sistema de secreción tipo IV (T4SS) esencial en la virulencia de la bacteria. Los T4SS son complejos multiproteicos que atraviesan la envoltura bacteriana y que están especializados en el transporte de proteínas y/o nucleoproteínas. Las funciones más comúnmente asignadas a estos sistemas de transporte han sido las de participar en la transferencia conjugativa entre bacterias y en la virulencia de bacterias patógenas mediando la secreción de toxinas o la inyección de moléculas efectoras al interior de la célula eucariótica, alterando así una serie de procesos celulares con el objetivo de incrementar la supervivencia de la bacteria (Backert & Meyer, 2006). No obstante, el modular procesos de la célula hospedadora para facilitar la infección bacteriana no parece ser función exclusiva de los T4SS de bacterias patógenas. Recientemente, se ha demostrado que el T4SS codificado en la isla simbiótica de *M. loti* desempeña un papel importante en la interacción con la leguminosa, modulando el rango de hospedador, de un modo similar al previamente descrito para los sistemas de secreción tipo III (T3SS). Resulta además curioso el hecho de que en los rizobios de los que se tiene información de su genoma, todos disponen o bien de un T3SS, uno o varios T4SS o T3SS y T4SS conjuntamente, sugiriendo una posible implicación de estos sistemas en la simbiosis.

Teniendo en cuenta todo esto, hemos investigado el posible papel de la región *virB* de *S. meliloti* en la interacción con leguminosas, analizando el fenotipo simbiótico tanto de mutantes que carecen de toda la región, como de mutantes en los que la expresión de los genes *virB* se halla desregulada. Los ensayos realizados con alfalfa y *M. truncatula* revelan que ni la ausencia ni la expresión descontrolada de estos genes, afectan a la infectividad, competitividad, o eficiencia simbiótica de la bacteria, indicando que la región *virB* de *S. meliloti* no es clave en el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno con leguminosas hospedadoras de esta bacteria. La no esencialidad de la región *virB* de *S. meliloti* en la simbiosis ha sido ya sugerida por otros autores que han analizado el fenotipo de cepas que carecían de algunos de los genes *virB* (Barnett *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2006). De forma similar pero en un trabajo mucho más reciente se ha descrito que el sistema VirB presente en el plásmido pRL7 de *R. leguminosarum* biovar *viciae* 3841 no es importante para el establecimiento de

simbiosis con plantas hospedadoras como guisante, judía y *V. hirsuta* (Krehenbrück & Downie, 2008).

Jones y colaboradores (2006) en un esfuerzo por asignar un papel simbiótico al sistema *VirB* de *S. meliloti*, han investigado la posibilidad de que éste pudiera funcionar como un determinante de invasión secundario que actuase conjuntamente con otro factor. Aunque aún no se puede descartar esa posibilidad, los autores demuestran que al menos el succinoglucano no parece ser el componente que tiene alguna relación con los teóricos efectores del T4SS. Otra posibilidad, es que la función del sistema *VirB* pudiera ser ejercida por otro sistema de secreción de proteínas presente en la bacteria. Se ha sugerido que los T4SS y T3SS de los rizobios son funcionalmente intercambiables (Hubber *et al.*, 2004). Tanto *S. meliloti* como *R. leguminosarum* bv. *viciae* carecen de genes *hrc*, pero sí disponen del T3SS correspondiente al aparato flagelar. Aunque no está considerado clásicamente como un sistema de secreción de proteínas, se ha demostrado que el aparato flagelar de *Salmonella* es capaz de secretar de forma activa una serie de productos que no están relacionadas con la biosíntesis del flagelo (Young *et al.*, 1999). Se ha visto además que efectores de T3SS que carecen de los dominios de unión a chaperonas específicas dejan de ser transportados por el T3SS y lo hacen por el aparato de secreción flagelar (Lee & Galán, 2004). Por tanto, no podemos descartar la posibilidad de que en determinadas circunstancias, este sistema pudiera secretar proteínas del T4SS. Teniendo en cuenta esto, sería interesante investigar el fenotipo simbiótico de un mutante de *S. meliloti* afectado tanto en el T4SS como en la secreción mediada por el aparato flagelar.

El hecho de que mutantes *virB* de *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, y de *M. loti* sigan siendo capaces de invadir a sus leguminosas hospedadoras, y que sin embargo α -proteobacterias muy relacionadas con los rizobios que son patógenos intracelulares de animales (especies de *Brucella* y *Bartonella*) requieran sus T4SS para mantener la infección intracelular, ha llevado a Jones y colaboradores (2006) a proponer que deben existir diferencias importantes en los determinantes requeridos para sobrevivir en el interior de un hospedador dependiendo de que éste pertenezca al reino animal o vegetal.

A diferencia de los estudios mencionados (Barnett *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2006), en este trabajo hemos investigado también el posible papel de la región *virB* de *S. meliloti* en la interacción con leguminosas no hospedadoras. En *M. loti*, el fenotipo más llamativo asociado a mutaciones en los genes *vir* se puso de manifiesto en

Leucaena leucocephala (Hubber *et al.*, 2004), una planta en la que la cepa silvestre induce nódulos no funcionales, pero mutaciones en los genes *vir* permiten a la bacteria invadir con éxito y fijar nitrógeno. Nuestra primera sorpresa fue comprobar que en algunas de las leguminosas no hospedadoras ensayadas, aunque en ningún caso se observaron nódulos fijadores de nitrógeno, sí hubo reacción de la planta tras la inoculación con las cepas de *S. meliloti*, desarrollándose o bien pequeños abultamientos como en el caso de garbanzo y veza, o estructuras macroscópicamente muy parecidas a nódulos blanquecinos como ocurrió en judía. Además, interesantemente, encontramos algunas diferencias asociadas a la presencia o no de la región *virB* que dependían tanto de la leguminosa como del fondo genético de la bacteria: 1021 o GR4. Así, en plantas de veza el mutante 1021*virB* induce mayor número de abultamientos en las raíces que 1021. Además, a diferencia de las cepas silvestres tanto 1021*virB* como GR4*virB* son capaces de invadir en cierta medida dichas estructuras. Al igual que en veza, en garbanzo la ausencia del sistema VirB en 1021*virB* parece incrementar el número de abultamientos vacíos inducidos por la bacteria. En el caso de judía, nos resultó llamativo el hecho de que fue posible aislar bacterias de los nódulos inducidos por todas las bacterias a excepción de 1021. El hecho de que la presencia/ausencia del sistema VirB conlleve variaciones en la capacidad infectiva o inductora de “pseudonódulos” parece sugerir que en *S. meliloti* este sistema podría modular algunas etapas de la interacción planta-bacteria, fenómeno que al igual que en *M. loti*, es dependiente tanto de la leguminosa como de la cepa bacteriana. El hecho de que no se haya observado un fenotipo tan llamativo como en *M. loti* puede ser debido a que no hemos ensayado la leguminosa adecuada y/o a que como sugieren Jones y colaboradores, los teóricos efectores secretados por VirB requieran la participación de otro factor con características peculiares, y/o que en ausencia de VirB, su función esté siendo desarrollada por otro sistema de secreción de proteínas.

Las proteínas del T4SS codificadas por los genes *virB* de *S. meliloti* muestran las mejores homologías con los correspondientes productos de los genes *avhB* del plásmido pAtC58 de *A. tumefaciens*, así como con los genes *virB* presentes en el plásmido simbiótico p42d de *R. etli*. El sistema AvhB de *A. tumefaciens* que a diferencia del sistema VirB del plásmido Ti no es esencial para la formación de tumores, funciona como sistema Mpf en la transferencia conjugativa del plásmido críptico pAtC58 así como en la movilización del plásmido heterólogo RSF1010 (Chen *et al.*, 2002). A diferencia de pAtC58, el pSymA de *S. meliloti* y también el p42d de *R.*

etli no se movilizan en condiciones de laboratorio, aunque contienen un sistema VirB que podría funcionar como Mpf, y homólogos a funciones Dtr: TraA, TraC, TraD y TraG. Hoy sabemos que esto es consecuencia de la acción del gen *rctA*, gen presente en pSymA y p42d ligado a los genes *virB*, y que ha sido recientemente identificado en nuestro grupo como regulador clave de la transferencia conjugativa de ambos plásmidos (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). En condiciones de laboratorio el producto de *rctA* reprime la expresión de funciones implicadas en transferencia, entre ellas los genes *virB*. Utilizando un fondo *rctA* de *S. meliloti*, hemos investigado la posible implicación del sistema VirB en transferencia conjugativa. Hemos demostrado que la región *virB* codifica un T4SS que funciona como sistema Mpf requerido en la transferencia conjugativa tanto del pSymA como de un derivado del plásmido RSF1010. Recientemente, el papel del sistema VirB de *S. meliloti* en transferencia conjugativa ha sido corroborado de manera independiente por otro laboratorio (Jones *et al.*, 2006).

El hecho de que el T4SS de *S. meliloti* esté implicado en transferencia conjugativa no descarta algún papel en el establecimiento de simbiosis con leguminosas. En la literatura existen descritos varios ejemplos de T4SS que han sido relacionados con en más de una función. Así, el sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens* o el Dot/Icm de *L. pneumophila* además de participar en la secreción de efectores a sus correspondientes hospedadores, han sido implicados en transferencia conjugativa (Chen *et al.*, 2002; Christie, 2001). Es importante, no obstante, recordar que se han descrito interferencias entre las funciones que pueden desarrollar estos T4SS. Así, en *Legionella*, la presencia de plásmidos movilizables como RSF1010, reducen la multiplicación de la bacteria en el interior de macrófagos y la muerte de éstos probablemente al competir con los sustratos naturales del aparato de secreción (Segal & Shuman, 1998). De forma similar, la presencia de RSF1010 en *Agrobacterium* inhibe el desarrollo de tumores en plantas al competir con la transferencia del complejo-T a las células vegetales (Stahl *et al.*, 1998). Puesto que no disponemos de evidencias que demuestren que el sistema VirB de *S. meliloti* participa en secreción de efectores, no hemos podido investigar si las condiciones que promueven la transferencia del pSymA interfieren con la secreción de proteínas efectoras. No obstante, la interferencia de la capacidad de una bacteria de interaccionar con un hospedador eucariota causada por la presencia de ciertos plásmidos movilizables no parece ser exclusivo de bacterias patógenas. En 1998 el grupo de M. Hynes describió una fuerte reducción en la fijación simbiótica de nitrógeno en cepas de *R. leguminosarum* biovar *viciae* portadoras de plásmidos RP4 (O'Connell *et al.*, 1998).

Mediante mutagénesis al azar de RP4 se identificaron variantes del plásmido que no causaban disminución de la eficiencia simbiótica de la bacteria, que curiosamente, resultaron estar afectadas en transferencia conjugativa. Si el efecto en efectividad simbiótica es consecuencia de la interferencia que pueda causar la transferencia de RP4 con la secreción mediada por el sistema VirB identificado en esta bacteria, no se ha investigado.

La expresión de sistemas tan complejos como los T4SS suele estar bajo un control estricto en el que influyen tanto la función ejercida por el transportador, como el estilo de vida de la bacteria. En general, los genes que codifican T4SS suelen activarse en respuesta a la percepción de señales medioambientales. En el caso concreto de bacterias que interaccionan con hospedadores eucariotas se cree que la expresión y ensamblaje de los T4SS responde a una combinación de moléculas inductoras específicas (por ej. los compuestos fenólicos exudados por las heridas de plantas) y señales medioambientales más generales (pH ácido, o escasez de nutrientes), que normalmente están presentes en el sitio de infección (Christie, 2004). Además se ha descrito la existencia de múltiples niveles de control a nivel tanto transcripcional como posttranscripcional destinados a conseguir la máxima eficacia con el mínimo coste energético. La expresión de los sistemas VirB del plásmido Ti de *A. tumefaciens* y de la isla simbiótica de *M. loti* está controlada por un sistema regulador de dos componentes codificado por los genes *virA* y *virG* que se encuentran flanqueando los genes *virB*. Este sistema regulador activa la expresión de los genes del T4SS en respuesta a señales específicas producidas por la planta. El análisis *in silico* de la región *virB* de *S. meliloti* no ha identificado genes homólogos a *virA* o *virG* ni cajas *vir* asociados al operón, sugiriendo la existencia de un mecanismo de regulación distinto al de *Agrobacterium* y *M. loti*. En la literatura hay dos referencias en las que se hace mención a la expresión de genes *virB* de *S. meliloti*. Estudios transcriptómicos realizados por Ampe y colaboradores (2003) en los que se comparó la expresión de genes de *S. meliloti* en condiciones de vida libre y simbiosis, sugerían que la región *virB* de esta bacteria se expresa preferencialmente durante el proceso de infección. En otro estudio de expresión génica global, sólo el gen *virB5* apareció inducido en condiciones microaeróbicas (Becker *et al.*, 2004). No hemos realizado los experimentos que corroboren estos datos. En cambio, nuestros estudios de expresión nos han llevado a dos importantes conclusiones: i) El gen SMA1322 localizado aguas arriba de *virB1* forma parte del operón *virB*, y ii) El producto de SMA1323 o *rctA* es un represor del operón, capaz de

bloquear la expresión de los genes *virB* actuando tanto en *cis* como *trans*, no sólo en *S. meliloti*, sino también en *Agrobacterium* e incluso *E. coli* (datos no mostrados).

SMA1322 no muestra homología significativa con proteínas de función conocida, aunque proteínas muy parecidas están también codificadas en los genomas de diversas bacterias por genes localizados aguas arriba de operones *virB*. Mediante experimentos de RT-PCR hemos demostrado que SMA1322 se transcribe junto con *virB1*, y al igual que éste su expresión se halla reprimida por RctA. Aunque no hemos demostrado que *virB2-virB11* forman un único operón con SMA1322 y *virB1*, es muy probable que el operón *virB* de *S. meliloti* esté constituido por 12 genes, cuya expresión está bajo el control de al menos un promotor situado aguas arriba de SMA1322. La presencia de 12 y no 11 genes es un rasgo distintivo más del T4SS de *S. meliloti* comparado con los VirB de *Agrobacterium* y *M. loti*. No es sin embargo, el primer caso descrito de un operón *virB* con más de 11 genes ya que los de *Brucella suis* y *X. citri* patovar *aurantifolii*, también están constituidos por 12 genes (Boschiroli *et al.*, 2002; El Yacoubi *et al.*, 2007). Se requieren experimentos adicionales para conocer si SMA1322 es esencial en la función del T4SS, así como saber si es constituyente del sistema de secreción o tiene algún otro papel relacionado con él.

RctA fue identificado originariamente en *R. etli* como un elemento clave en el control de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de la bacteria (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). La presencia de un gen *rctA* funcional reprime la expresión de funciones de transferencia (Dtr y Mpf) y por tanto la transferencia conjugativa de p42d. Posteriormente, homólogos a este gen se encontraron también en el pSymA de *S. meliloti* y en pAtC58 de *A. tumefaciens*, asociados a genes *virB/avhB*. Se demostró, que al igual que en *R. etli*, la transferencia conjugativa de pSymA en condiciones de laboratorio estaba inhibida por el gen *rctA* de *S. meliloti* (SMA1323), el cual reprime la expresión de funciones Dtr (*traA1* y *traC*). Aquí hemos demostrado que *SmrctA* reprime además la expresión del operón *virB* y que este efecto se ejerce en *cis*, *trans* y en distintos fondos genéticos. Resulta curioso el hecho de que el plásmido pAtC58 se halla descrito como autotransmisible en condiciones de laboratorio cuando, al igual que en el pSymA y en el p42d, existe un homólogo a *rctA* (Atu5160) ligado a los genes que codifican el T4SS. Se sabe además que la sobre-expresión de *Atu5160* desde un promotor heterólogo bloquea la transferencia conjugativa de p42d en el fondo genético de *R. etli* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005), demostrando la funcionalidad del gen como represor de las funciones de transferencia. Sin embargo, en este trabajo hemos analizado

la expresión de los genes *virB* de *S. meliloti* en un fondo de *Agrobacterium* que contiene Atu5160 y hemos comprobado que este gen no tiene ningún efecto en la expresión de los genes *SmvirB*. Una posible explicación a estos resultados es que el gen *rctA* de *Agrobacterium* no se exprese en las condiciones experimentales ensayadas, o bien que aunque se exprese, el efecto represor de la proteína se vea contrarrestado por algún otro factor en el fondo de *Agrobacterium*. Experimentos que validen alguna de estas hipótesis pueden contribuir a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la transferencia de plásmidos nativos en bacterias que interactúan con plantas, y permitirían conocer si además de elementos comunes de control, existen mecanismos diferenciales entre unas bacterias y otras.

Hasta la fecha no hemos podido identificar cuáles son las señales ambientales que liberan al operón *SmvirB* de la represión ejercida por RctA. Si tenemos en cuenta los resultados de Ampe y colaboradores (2003) obtenidos en experimentos con macroarrays que sugieren que los genes *virB* se inducen durante el proceso de infección de *M. truncatula*, podríamos pensar que la señal podría tener un origen vegetal o estar relacionada de alguna manera con las primeras etapas del proceso simbiótico. Nuestros datos demuestran que al menos la adición de luteolina en condiciones de vida libre, no es suficiente para liberar la represión. Quizás la presencia física del hospedador sea requerida junto con la producción de una determinada señal. Resultados preliminares parecen indicar que la expresión de los genes *virB* se induce en determinados fondos genéticos, en respuesta al crecimiento sobre una superficie sólida.

La demostración de la esencialidad de la región *virB* de *S. meliloti* en la transferencia conjugativa de pSymA y pML122 es suficiente para defender que esta región codifica un T4SS que al menos funciona como Mpf. Otras estrategias, sin embargo, abordadas también en este trabajo para demostrar el papel de este sistema como T4SS dedicado a la secreción de efectores, no han dado resultados positivos. Así, no hemos podido identificar ninguna proteína de *S. meliloti* cuya secreción sea dependiente de VirB, ni hemos podido complementar la virulencia de mutantes *virB* de *A. tumefaciens*. Aunque puede haber otras, la primera causa responsable de estos resultados negativos ha sido la no expresión de los genes *SmvirB* en las dos condiciones experimentales. En las dos aproximaciones, el gen *rctA* de *S. meliloti* estuvo presente, reprimiendo la expresión del operón *virB*. En el experimento de complementación de los mutantes de *Agrobacterium*, intentamos con distintas estrategias obtener una construcción que contuviera el operón *virB* sin el gen *rctA*, pero todas fueron

infructuosas. Una posible explicación es que la sobre-expresión del sistema, causada por la eliminación del represor y el efecto extra-copia de los replicones utilizados, tenga consecuencias nocivas en la célula, desestabilizando la estructura y composición de la envoltura bacteriana. De hecho, se ha descrito que la sobre-expresión inducible de algunas proteínas VirB de *B. suis* en un mutante de *Agrobacterium*, da lugar a una mayor sensibilidad de la célula a bajas concentraciones de detergente (Carle *et al.*, 2006). Por otro lado, hemos comprobado que no sólo la presencia de *SmrctA* afectó negativamente la expresión de los genes *SmvirB* en *Agrobacterium*, sino que las condiciones inductoras de los genes *vir* también reducían en más de 2-3 veces los niveles de expresión del operón. Esta misma causa puede ser la responsable de la reducción en dos órdenes de magnitud de la frecuencia de transferencia de pAtC58 que se ha descrito que se produce en condiciones inductoras de los genes *vir* (Chen *et al.*, 2002), y quizás también la responsable de que el sistema AvhB no pueda complementar la virulencia de mutantes *virB* de *Agrobacterium* (Stachel & Nester, 1986). Parece por tanto que las condiciones particulares que activan la expresión de un determinado T4SS en un fondo genético, pueden interferir en la expresión de otro distinto. Por ello, y al menos para salvar un posible problema de expresión, lo ideal en un experimento de complementación de mutantes *virB* con un sistema heterólogo, sería colocar el operón cuya funcionalidad como T4SS se va a analizar, bajo el mismo control que tiene el sistema VirB endógeno. Salvado el problema de expresión, hoy sabemos que conseguir la complementación de mutantes de *Agrobacterium* con sistemas heterólogos no es tan obvio. Aunque se ha conseguido la complementación total o parcial del fenotipo de mutantes *virB1* y *virB4* de *Agrobacterium* con los ortólogos correspondientes de *B. suis* (Yuan *et al.*, 2005; Hoppner *et al.*, 2004), la expresión del operón completo de *Brucella* desde el promotor inducible *trc* no consigue restaurar la virulencia de un mutante de *Agrobacterium* carente de su operón *virB* (Carle *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que quizás no todas las proteínas VirB sean intercambiables, o bien que la sobreexpresión del sistema puede dar lugar a la producción de proteínas en una estequiometría que no permite un ensamblaje funcional. Además, no hay que olvidar la especificidad de la proteína acopladora de *Agrobacterium* (VirD4) que pone en contacto los sustratos a ser transportados con el T4SS, hecho que podría sin duda dificultar la complementación heteróloga.

La detección de posibles efectores secretados por el T4SS de *S. meliloti* requiere previamente la identificación de las condiciones ambientales que permiten la

expresión del sistema, manteniendo en mente que puede ser posible que las condiciones que rigen su expresión destinada a la transferencia conjugativa del pSymA sean distintas de las que permiten la secreción de efectores, e incluso interferir entre ellas. Mientras tanto, una buena aproximación puede consistir en comparar el perfil de proteínas secretadas entre un mutante *fliFrctA* en el que sabemos existe expresión de VirB y un mutante *fliFrctAvirB*.

En resumen, hemos demostrado que la región *virB* de *S. meliloti* codifica componentes de un T4SS que puede funcionar al menos como sistema Mpf en la transferencia conjugativa de plásmidos, siendo el plásmido simbiótico de 1,35 Mb uno de ellos. Aunque por sí solos, los genes *virB1-virB11* no son esenciales en el establecimiento de simbiosis con leguminosas hospedadoras, hemos encontrado algunas evidencias de un posible papel del T4SS en la interacción planta-bacteria. Aunque se ha identificado un regulador clave en la expresión del sistema VirB, el conocimiento de las condiciones específicas que disparan la expresión de este sistema, permitirán en un futuro profundizar sobre el papel de estos genes en la interacción *Rhizobium*-leguminosa.

CONCLUSIONES

1. La presencia de un gen *pgi* (fosfoglucoisomerasa) aguas abajo o en las proximidades del gen *fadD*, es un hecho frecuente entre los rizobios en los que además existe un alto grado de conservación de las proteínas codificadas por estos genes. Por el contrario, la presencia del elemento RIME3 en la región intergénica *fadD-pgi* es exclusiva de *S. meliloti*.
2. El locus SMc02163, localizado aguas abajo del gen *fadD* de *S. meliloti*, codifica una proteína fosfoglucoisomerasa (PGI) que participa en la interconversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. Esta proteína forma homodímeros y su actividad enzimática es inhibida por monosacáridos fosforilados, características compartidas por otros miembros de la Subfamilia I de PGIs convencionales.
3. Aunque *S. meliloti* dispone de tres genes que codifican proteínas con actividad fosfoglucoisomerasa, el producto codificado por SMc02163 constituye la actividad PGI mayoritaria de la bacteria en todas las condiciones experimentales ensayadas.
4. La actividad PGI codificada por SMc02163 desempeña un papel importante en el modo de vida saprofítico de *S. meliloti*. Por un lado, contribuye a eliminar el efecto tóxico de la acumulación de fructosa-6-P generada en el catabolismo de ciertas fuentes carbonadas, y además participa en la adaptación de la bacteria frente a un estrés hiperosmótico, por un mecanismo hasta la fecha no caracterizado.
5. El comportamiento simbiótico de *S. meliloti* es altamente dependiente de la actividad PGI codificada por SMc02163. Su ausencia conduce a una notable menor infectividad, competitividad y eficiencia simbiótica en plantas de alfalfa. Estos defectos simbióticos son al menos parcialmente consecuencia de la menor capacidad de adsorción y colonización de las raíces de la leguminosa mostrada por la bacteria deficiente en actividad PGI, fenotipos que a su vez podrían ser explicados por las limitaciones que presenta en producción de polisacáridos superficiales (EPS) y en crecimiento.
6. La expresión en vida libre del gen SMc02163 se encuentra regulada por la fase de crecimiento bacteriano y las condiciones osmóticas del medio, siendo máxima en fase exponencial y en medio hipersalino. Este gen además se expresa en diferentes etapas de desarrollo del nódulo aunque en el estado de bacteroide la expresión es inferior a la

CONCLUSIONES

mostrada en vida libre, reducción que no parece ser consecuencia de la utilización de ácidos dicarboxílicos y que sugiere que el estado metabólico de la forma endosimbiótica de la bacteria podría asemejarse al de una bacteria en fase estacionaria de crecimiento.

7. La PGI de *S. meliloti* codificada por SMc02163 muestra actividad citoquina AMF (factor autocrino de movilidad) en células de fibrosarcoma, similar a la mostrada por el factor PGI/AMF humano, una característica que podría tener aplicaciones biotecnológicas.

8. La región *virB* de *S. meliloti* codifica un T4SS que participa en la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico pSymA y del plásmido IncQ pML122, actuando como complejo Mpf o complejo del poro.

9. El sistema *virB* de *S. meliloti* no es esencial en el establecimiento de simbiosis con leguminosas con las que la bacteria establece interacciones compatibles. No obstante, experimentos realizados en leguminosas no hospedadoras sugieren que este sistema puede desempeñar un papel modulador de algunas etapas de la interacción planta-bacteria, fenómeno que es dependiente tanto de la leguminosa como de la cepa bacteriana.

10. La región *virB* de *S. meliloti* está constituida por doce genes cuya expresión en condiciones de laboratorio se encuentra reprimida por la acción del regulador transcripcional RctA.

BIBLIOGRAFÍA

Albus U., Baier R., Holst O., Pühler A., & Niehaus K. (2001) Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytol.* 151, 597-606.

Ampe F., Kiss E., Sabourdy F., & Batut J. (2003) Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol.* 4, R15

Amraei M., Jia Z.J., Reboul P., & Nabi I.R. (2003) Acid-induced conformational changes in phosphoglucose isomerase result in its increased cell surface association and deposition on fibronectin fibrils. *J. Biol. Chem.* 278, 38935-38941.

Amraei M. & Nabi I.R. (2002) Species specificity of the cytokine function of phosphoglucose isomerase. *FEBS Lett.* 525, 151-155.

Anollés G.C. & Favelukes G. (1986) Quantitation of adsorption of rhizobia in low numbers to small legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 371-376.

Arias A., Cervenansky C., Gardiol A., & Martínez-Drets G. (1979) Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 137, 409-414.

Ausubel F.M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6, 973-979.

Backert S. & Meyer T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 207-217.

Barber C.E., Tang J.L., Feng J.X., Pan M.Q., Wilson T.J.G., Slater H., Dow J.M., Williams P., & Daniels M.J. (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* 24, 555-566.

Barnett M.J., Fisher R.F., Jones T., Komp C., Abola A.P., Barloy-Hubler F., Bowser L., Capela D., Galibert F., Gouzy J., Gurjal M., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Palm C., Peck M.C., Surzycki R., Wells D.H., Yeh K.C., Davis R.W., Federspiel N.A., & Long S.R. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9883-9888.

Bartsev A.V., Deakin W.J., Boukli N.M., McAlvin C.B., Stacey G., Malnoe P., Broughton W.J., & Staehelin C. (2004) NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol.* 134, 871-879.

Batut J., Andersson S.G., & O'Callaghan D. (2004) The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 933-945.

Baudouin E., Pieuchot L., Engler G., Pauly N., & Puppo A. (2006) Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 970-975.

Bauer W.D. & Mathesius U. (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7, 429-433.

- Becker A., Berges H., Krol E., Bruand C., Ruberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F.J., Fourment J., Francez-Charlot A., Kahn D., Kuster H., Liebe C., Pühler A., Weidner S., & Batut J. (2004)** Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 292-303.
- Becker A., Fraysse N., & Sharypova L. (2005)** Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 899-905.
- Becker A., Kleickmann A., Keller M., Arnold W., & Puhler A. (1993)** Identification and analysis of the *Rhizobium-Meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. *Mol. Gen. Genet.* 241, 367-379.
- Becker A. & Pühler A. (1998)** Production of exopolysaccharides. En: *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria* (Spaink H.P., Kondorosi A., & Hooykaas P.J.J., eds) Kluwer Academic Publishers, pp 97-115.
- Beier D. & Gross R. (2006)** Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 143-152.
- Bell K.S., Sebahia M., Pritchard L., Holden M.T.G., Hyman L.J., Holeva M.C., Thomson N.R., Bentley S.D., Churcher L.J.C., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Quail M.A., Sanders M., Walker D., Whitehead S., Salmond G.P.C., Birch P.R.J., Parkhill J., & Toth I.K. (2004)** Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11105-11110.
- Beringer J.E. (1974)** R factor transfer in *Rhizobium-Leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84, 188-198.
- Bittinger M.A., Gross J.A., Widom J., Clardy J., & Handelsman J. (2000)** *Rhizobium etli* CE3 carries *vir* gene homologs on a self-transmissible plasmid. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 1019-1021.
- Blum H., Beier H., & Gross H.J. (1987)** Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. 8, 93-99.
- Böhringer J., Fischer D., Mosler G., & Henggearonis R. (1995)** UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of sigma(S) and sigma(S)-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 413-422.
- Boivin C., Camut S., Malpica C.A., Truchet G., & Rosenberg C. (1990)** *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell.* 2, 1157-1170.
- Boller T. (2005)** Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 116-122.

Boschiroli M.L., Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S., Bourg G., Allardet-Servent A., Cazevielle C., Liautard J.P., Ramuz M., & O'Callaghan D. (2002) The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1544-1549.

Bourzac K.M. & Guillemin K. (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol.* 7, 911-919.

Bradford M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

Brencic A. & Winans S.C. (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 155-94.

Bueno P., Soto M.J., Rodríguez-Rosales M.P., Sanjuán J., Olivares J., & Donaire J.P. (2001) Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytol.* 152, 91-96.

Canonaco F., Hess T.A., Heri S., Wang T.T., Szyperski T., & Sauer U. (2001) Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 247-252.

Carle A., Hoppner C., Ahmed A.K., Yuan Q., Dulk-Ras A., Vergunst A., O'Callaghan D., & Baron C. (2006) The *Brucella suis* type IV secretion system assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases IncQ plasmid pLS1 recipient competence. *Infect. Immun.* 74, 108-117.

Casadesús J, Olivares J. (1979) General transduction in *Rhizobium meliloti* by a thermosensitive mutant of bacteriophage DF2. *J. Bacteriol.* 139, 316-317.

Cascales E. & Christie P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 137-149.

Charles T.C. & Nester E.W. (1993) A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 175, 6614-6625.

Chen L., Chen Y., Wood D.W., & Nester E.W. (2002) A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 184, 4838-4845.

Cheng H.P. & Walker G.C. (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180, 5183-5191.

Christie P.J. (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40, 294-305.

Christie P.J. (2004) Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys Acta.* 1694, 219-234.

Christie P.J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S., & Cascales E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 451-485.

Cooper J.E. (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1355-1365.

Corzo Varillas J., Hernández Hernández J., & Gutiérrez Navarro A. (2006) Polisacáridos y lipopolisacáridos rizobianos. Estructura y papel en la simbiosis. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones* (Bedmar E.J., González J., Lluich C., & Rodelas B., eds) Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp 148-159.

Cubo M.T., Economou A., Murphy G., Johnston A.W., & Downie J.A. (1992) Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes rhiABCR that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* 174, 4026-4035.

D'Haese W., De Rycke R., Mathis R., Goormachtig S., Pagnotta S., Verplancke C., Capoen W., & Holsters M. (2003) Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11789-11794.

D'Haese W., Glushka J., De Rycke R., Holsters M., & Carlson R.W. (2004) Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol. Microbiol.* 52, 485-500.

D'Haese W. & Holsters M. (2004) Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends Microbiol.* 12, 555-561.

Dakora F.D., Joseph C.M., & Phillips D.A. (1993) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 101, 819-824.

Dakora F.D. & Phillips D.A. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil.* 245, 35-47.

Davies C., Muirhead H., & Chirgwin J. (2003) The structure of human phosphoglucose isomerase complexed with a transition-state analogue. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 1111-1113.

Deakin W.J., Marie C., Saad M.M., Krishnan H.B., & Broughton W.J. (2005) NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 499-507.

Delrue R.M., Deschamps C., Leonard S., Nijskens C., Danese I., Schaus J.M., Bonnot S., Ferooz J., Tibor A., De Bolle X., & Letesson J.J. (2005) A quorum-

sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol.* 7, 1151-1161.

Delsal G., Manfioletti G., & Schneider C. (1988) A one tube plasmid DNA mini preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 16, 9878.

Ding Z.Y., Atmakuri K., & Christie P.J. (2003) The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* 11, 527-535.

Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C. J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501

Ditta G., Schmidhauser T., Yakobson E., Lu P., Liang X.W., Finlay D.R., Guiney D., & Helinski D.R. (1985) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene-expression. *Plasmid.* 13, 149-153.

Domínguez-Ferrerías A. (2007) Identificación y caracterización de genes de osmoadaptación en *Rhizobium* y de su papel en simbiosis con leguminosas. Universidad de Granada. Tesis Doctoral, Granada.

Domínguez-Ferrerías A., Pérez-Arnedo R., Becker A., Olivares J., Soto M.J., & Sanjuán J. (2006) Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188, 7617-7625.

Dong X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316-323.

Dower W.J., Miller J.F., & Ragsdale C.W. (1988) High-efficiency transformation of *Escherichia coli* by high-voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.

Downie J.A. & Surin B.P. (1990) Either of two *nod* gene loci can complement the nodulation defect of a *nod* deletion mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv viciae. *Mol. Gen. Genet.* 222, 81-86.

Downie J.A. & Walker S.A. (1999) Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 483-489.

Dozot M., Boigegrain R.A., Delrue R.M., Hallez R., Ouahrani-Bettache S., Danese I., Letesson J.J., De Bolle X., & Kohler S. (2006) The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system *virB*. *Cell Microbiol.* 8, 1791-1802.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., & Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28, 350-356.

Durner J. & Klessig D.F. (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 369-374.

Dykhuisen D.E. & Hartl D.L. (1983) Functional effects of PGI allozymes in *Escherichia coli*. *Genetics.* 105, 1-18.

- Dylan T., Helinski D.R., & Ditta G.S. (1990)** Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1->2)-glucan. *J. Bacteriol.* 172, 1400-1408.
- Dyson J.E. & Noltmann E.A. (1968)** The effect of pH and temperature on the kinetic parameters of phosphoglucose isomerase. Participation of histidine and lysine in a proposed dual function mechanism. *J. Biol. Chem.* 243, 1401-1414.
- Egelhoff T.T. & Long S.R. (1985)** *Rhizobium meliloti* nodulation genes : Identification of *nodDABC* gene products, purification of *nodA* protein, and expression of *nodA* in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 164, 591-599.
- El Yacoubi B., Brunings A.M., Yuan Q., Shankar S., & Gabriel D.W. (2007)** In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Appl Environ. Microbiol.* 73, 1612-1621.
- Ellermeier C.D. & Slauch J.M. (2003)** *RtsA* and *RtsB* coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* 185, 5096-5108.
- Engledow A.S., Medrano E.G., Mahenthiralingam E., Lipuma J.J., & González C.F. (2004)** Involvement of a plasmid-encoded type IV secretion system in the plant tissue water soaking phenotype of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Bacteriol.* 186, 6015-6024.
- Fellay R., Frey J., & Krisch H. (1987)** Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: A family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram negative bacteria. *Gene.* 52, 147-154.
- Ferguson B.J. & Mathesius U. (2003)** Signaling interactions during nodule development. *J. Plant. Growth. Regul.* 22, 47-72.
- Ferguson G.P., Datta A., Baumgartner J., Roop R.M., Carlson R.W., & Walker G.C. (2004)** Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* *BacA* affect lipid-A fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5012-5017.
- Ferguson G.P., Datta A., Carlson R.W., & Walker G.C. (2005)** Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 56, 68-80.
- Fernández-Lopez M, Goormachtig S, Gao M, D'Haeze W, Van Montagu M , Holsters M. (1998)** Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12724-8.
- Figurski D.H. & Helinski D.R. (1979)** Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 1648-1652.
- Finan T.M., Hartweg E., Lemieux K., Bergman K., Walker G.C., & Signer E.R. (1984)** General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 159, 120-124.

- Fischer H.M., Babst M., Kaspar T., Acuna G., Arigoni F., & Hennecke H. (1993)** One member of a groESL-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is coregulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *EMBO J.* 12, 2901-2912.
- Fisher R.F. & Long S.R. (1992)** Rhizobium--plant signal exchange. *Nature.* 357, 655-660.
- Fouhy Y., Lucey J.F., Ryan R.P., & Dow J.M. (2006)** Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res. Microbiol.* 157, 899-904.
- Forsberg L.S. & Reuhs B.L. (1997)** Structural characterization of the K antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 179, 5366-5371.
- Fraenkel D.G. (1968)** The accumulation of glucose 6-phosphate from glucose and its effect in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 243, 6451-6457.
- Fraenkel D.G. & Levisohn S.R. (1967)** Glucose and gluconate metabolism in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase. *J. Bacteriol.* 93, 1571-&.
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C., & Bisseling T. (1992)** Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19, 89-107.
- Frayse N., Couderc F., & Poinso V. (2003)** Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270, 1365-1380.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., & Perret X. (1997)** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 387, 394-401.
- Friedman A.M., Long S.R., Brown S.E., Buikema W.J., & Ausubel F.M. (1982)** Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene.* 18, 289-296.
- Funasaka T., Hu H., Hogan V., & Raz A. (2007)** Down-regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression sensitizes human fibrosarcoma cells to oxidative stress leading to cellular senescence. *J Biol Chem.* 282, 36362-36369.
- Funasaka T. & Raz A. (2007)** The role of autocrine motility factor in tumor and tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 725-735.
- Fuqua W.C., Winans S.C., & Greenberg E.P. (1994)** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269-275.
- Gage D.J. & Margolin W. (2000)** Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 613-617.

Galán J.E. & Collmer A. (1999) Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 284, 1322-1328.

Galibert F., Finan T.M., Long S.R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M.J., Becker A., Boistard P., Bothe G., Boutry M., Bowser L., Buhrmester J., Cadieu E., Capela D., Chain P., Cowie A., Davis R.W., Dreano S., Federspiel N.A., Fisher R.F., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Golding B., Gouzy J., Gurjal M., Hernández-Lucas I., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Jones T., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Kiss E., Komp C., Lelaure V., Masuy D., Palm C., Peck M.C., Pohl T.M., Portetelle D., Purnelle B., Ramsperger U., Surzycki R., Thebault P., Vandenbol M., Vorholter F.J., Weidner S., Wells D.H., Wong K., Yeh K.C., & Batut J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*. 293, 668-672.

Gao M., Chen H., Eberhard A., Gronquist M.R., Robinson J.B., Rolfe B.G., & Bauer W.D. (2005) *sinI*- and *expR*-dependent quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187, 7931-7944.

García-Rodríguez F.M. & Toro N. (2000) *Sinorhizobium meliloti* nfe (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 583-591.

Geurts R., Fedorova E., & Bisseling T. (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8, 346-352.

Glenn S.A., Gurich N., Feeney M.A., & Gonzalez J.E. (2007) The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 189, 7077-7088.

Gómez-Gómez L. & Boller T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7, 251-256.

González J.E. & Marketon M.M. (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 67, 574-592.

González V., Bustos P., Ramírez-Romero M.A., Medrano-Soto A., Salgado H., Hernández-González I., Hernández-Celis J.C., Quintero V., Moreno-Hagelsieb G., Girard L., Rodríguez O., Flores M., Cevallos M.A., Collado-Vides J., Romero D., & Dávila G. (2003) The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol.* 4, R36.

Goormachtig S., Lievens S., Van d., V, Van Montagu M., & Holsters M. (1998) Srch13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plant Cell.* 10, 905-915.

Gosselin I., Wattraint O., Riboul D., Barbotin J.N., & Portais J.C. (2001) A deeper investigation on carbohydrate cycling in *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett.* 499, 45-49.

Haga A., Niinaka Y., & Raz A. (2000) Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein. *Biochim. Biophys. Acta Protein. Struct. Mol. Enzymol.* 1480, 235-244.

Haga A., Tanaka N., Funasaka T., Hashimoto K., Nakamura K.T., Watanabe H., Raz A., & Nagase H. (2006) The autocrine motility factor (AMF) and AMF-receptor combination needs sugar chain recognition ability and interaction using the C-terminal region of AMF. *J. Mol. Biol.* 358, 741-753.

Heidstra R, Yang W C, Yalcin Y, Peck S, Emons A, van Kammen A, Bisseling T. (1997) Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development.* 124, 1781–1787.

Halverson L.J. & Stacey G. (1986) Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* 50, 193-225.

Hansen T., Schlichting B., Felgendreher M., & Schonheit P. (2005) Cupin-type phosphoglucose isomerases (cupin-PGIs) constitute a novel metal-dependent PGI family representing a convergent line of PGI evolution. *J. Bacteriol.* 187, 1621-1631.

Hansen T. & Schonheit P. (2005) Escherichia coli phosphoglucose isomerase can be substituted by members of the PGI family, the PGI/PMI family, and the cPGI family. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 49-53.

Hansen T., Urbanke C., & Schonheit P. (2004) Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. 8, 507-512.

Hardy R.W.F., Burns R.C., & Holsten R.D. (1973) Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5, 47-81.

Harrison J., Jamet A., Muglia C.I., Van de Sype G., Aguilar O.M., Puppo A., & Frendo P. (2005) Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187, 168-174.

Hattermann D.R. & Stacey G. (1990) Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. *Appl. Environ. Microb.* 56, 833-836.

He X.S. & Fuqua C. (2006) Rhizosphere communication: Quorum sensing by the rhizobia. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 1661-1677.

Hedrick J.L. & Smith A.J. (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155-&.

Hérouart D., Baudouin E., Frendo P., Harrison J., Santos R., Jamet A., Van de Sype G., Touati D., & Puppo A. (2002) Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? *Plant Physiol. Biochem.* 40, 619-624.

Hirsch A.M., Lum M.R., & Downie J.A. (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127, 1484-1492.

- Hoang H.H., Becker A., & González J.E. (2004)** The LuxR homolog ExpR, in combination with the sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* 186, 5460-5472.
- Hoang H.H., Gurich N., & Gonzalez J.E. (2008)** Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 190, 861-871.
- Hofreuter D., Odenbreit S., & Haas R. (2001)** Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 41, 379-391.
- Hooykaas P.J.J., Hofker M., Dendulkas H., & Schilperoort R.A. (1984)** A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmid, a Nopaline Ti plasmid, and an Ri plasmid by complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* mutants. *Plasmid.* 11, 195-205.
- Hooykaas P.J.J., Klapwijk P.M., Nuti M.P., Schilperoort R.A., & Rörsch A. (1977)** Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *Agrobacteria* and *Rhizobium ex planta*. *J. Gen. Microbiol.* 98, 477-484.
- Hoppner C., Liu Z.Y., Domke N., Binns A.N., & Baron C. (2004)** VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 186, 1415-1422.
- Howell E.E. & Schray K.J. (1981)** Comparative inactivation and inhibition of the anomerase and isomerase activities of phosphoglucose isomerase. *Mol. Cell. Biochem.* 37, 101-107.
- Hubber A., Vergunst A.C., Sullivan J.T., Hooykaas P.J., & Ronson C.W. (2004)** Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 54, 561-574.
- Hubber A.M., Sullivan J.T., & Ronson C.W. (2007)** Symbiosis-induced cascade regulation of the *Mesorhizobium loti* R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 255-261.
- Hueck C.J. (1998)** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 379-433.
- Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, Fukui K. (2007)** Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 189, 950-957
- Jamet A., Sigaud S., Van de S.G., Puppo A., & Herouart D. (2003)** Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 217-225.
- Jiménez-zurdo J.I., García-Rodríguez F.M., & Toro N. (1997)** The *Rhizobium meliloti* *putA* gene: Its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol. Microbiol.* 23, 85-93.

- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., & Walker G.C. (2007a)** How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 619-633.
- Jones K.M., Lloret J., Daniele J.R., & Walker G.C. (2007b)** The type IV secretion system of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 is required for conjugation, but not for intracellular symbiosis. *J. Bacteriol.* 189, 2133-2138.
- Jones K.M., Sharopova N., Lohar D.P., Zhang J.Q., VandenBosch K.A., & Walker G.C. (2008)** Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 704-709.
- Judd P.K., Kumar R.B., & Das A. (2005)** Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11498-11503.
- Kahn M. & Hanawalt P. (1979)** Size distribution of DNA replicative intermediates in bacteriophage-P4 and in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 128, 501-525.
- Kanno H., Fujii H., & Miwa S. (1998)** Expression and enzymatic characterization of human glucose phosphate isomerase (GPI) variants accounting for GPI deficiency. *Blood Cells Mol. Dis.* 24, 54-61.
- Katz L.A. (1996)** Transkingdom transfer of the phosphoglucose isomerase gene. *J. Mol. Evol.* 43, 453-459.
- Keller M., Roxlau A., Weng W.M., Schmidt M., Quandt J., Niehaus K., Jording D., Arnold W., & Pühler A. (1995)** Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 267-277.
- Kimata K., Inada T., Tagami H., & Aiba H. (1998)** A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 29, 1509-1519.
- Kimata K., Tanaka Y., Inada T., & Aiba H. (2001)** Expression of the glucose transporter gene, *ptsG*, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20, 3587-3595.
- Koekman B.P., Hooykaas P.J.J., & Schilperoort R.A. (1982)** A functional map of the replicator region of the octopine Ti plasmid. *Plasmid.* 7, 119-132.
- Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., Robertson G.T., Farris M.A., Roop R.M., & Peterson K.M. (1995)** Four new derivatives of the broad host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic resistance cassettes. *Gene.* 166, 175-176.
- Krause A., Lan V.T., & Broughton W.J. (1997)** Induction of chalcone synthase expression by rhizobia and nod factors in root hairs and roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 388-393.

- Krehenbrink M. & Downie J.A. (2008)** Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC Genomics*. 9, 55.
- Kuppusamy K.T., Endre G., Prabhu R., Penmetsa R.V., Veereshlingam H., Cook D.R., Dickstein R., & Vandenbosch K.A. (2004)** LIN, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiol*. 136, 3682-3691.
- Labes, M. Pühler A, Simon R. (1990)** A new family of RSF1010-derived expression and lac-fusion broad-host-range vectors for gram-negative bacteria. *Gene*. 30;89(1):37-46
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*. 227, 680-5.
- Lamb C. & Dixon R.A. (1997)** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lamotte O., Courtois C., Barnavon L., Pugin A., & Wendehenne D. (2005)** Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*. 221, 1-4.
- Laus M.C., Logman T.J., Lamers G.E., Van Brussel A.A.N., Carlson R.W., & Kijne J.W. (2006)** A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microbiol.* 59, 1704-1713.
- Lederberg E.M. & Cohen S.N. (1974)** Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119, 1072-1074.
- Lee J.H., Chang K.Z., Patel V., & Jeffery C.J. (2001)** Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with its substrate D-fructose 6-phosphate. *Protein Sci.* 40, 7799-7805.
- Lee K.H. & Larue T.A. (1992)** Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol.* 100, 1759-1763.
- Lee S.H. & Galan J.E. (2004)** Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol.* 51, 483-495.
- Leonard L.T. (1943)** A simple assembly for use in the testing of cultures of rhizobia. *J. Bacteriol.* 45, 523-527.
- Lerouge I. & Vanderleyden J. (2002)** O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 17-47.
- LeVier K., Phillips R.W., Grippe V.K., Roop R.M., & Walker G.C. (2000)** Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science*. 287, 2492-2493.
- Li L., Jia Y., Hou Q., Charles T.C., Nester E.W., & Pan S.Q. (2002)** A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12369-12374.

- Ligero, F.; Lluch, C.; Olivares, J. (1986)** Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. *J. Plant. Physiol.* 125, 361-365
- Liu P. & Nester E.W. (2006)** Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits *vir* gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4658-4662.
- Lloret J., Wulff B.B.H., Rubio J.M., Downie J.A., Bonilla I., & Rivilla R. (1998)** Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1024-1028.
- Loh J., Carlson R.W., York W.S., & Stacey G. (2002)** Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14446-14451.
- Lohar D.P., Haridas S., Gantt J.S., & VandenBosch K.A. (2007)** A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol.* 173, 39-49.
- Lucas R.L., Lostroh C.P., DiRusso C.C., Spector M.P., Wanner B.L., & Lee C.A. (2000)** Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* 182, 1872-1882.
- Lugtenberg B. & van Alphen L. (1983)** Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 737, 51-115.
- Ma W.B., Penrose D.M., & Glick B.R. (2002)** Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. *Can. J. Microbiol.* 48, 947-954.
- Marie C., Broughton W.J., & Deakin W.J. (2001)** *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 336-342.
- Marie C., Deakin W.J., Ojanen-Reuhs T., Diallo E., Reuhs B., Broughton W.J., & Perret X. (2004)** TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 958-966.
- Martínez-Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P., Sanjuán J., Bisseling T., & Olivares J. (1998)** Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti* - Alfalfa symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 153-155.
- Masui S., Sasaki T., & Ishikawa H. (2000)** Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods. *J. Bacteriol.* 182, 6529-6531.
- Mateos P.F., Baker D.L., Petersen M., Velazquez E., Jimenez-Zurdo J.I., Martinez-Molina E., Squartini A., Orgambide G., Hubbell D.H., & Dazzo F.B. (2001)** Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can. J. Microbiol.* 47, 475-487.

- Mathesius U., Mulders S., Gao M.S., Teplitski M., Caetano-Anolles G., Rolfe B.G., & Bauer W.D. (2003)** Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1444-1449.
- Mathesius U., Schlaman H.R., Spaink H.P., Of S.C., Rolfe B.G., & Djordjevic M.A. (1998)** Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14, 23-34.
- Mathis R., Van Gijsegem F., De Rycke R., D'Haese W., Van Maelsaeke E., Anthonio E., Van Montagu M., Holsters M., & Vereecke D. (2005)** Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2655-2660.
- Matthysse A.G. & Kijne J.W. (1998)** Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. En: *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria* (Spaink H.P., Kondorosi A., & Hooykaas P.J.J., eds) Kluwer Academic Publishers, pp 235-249.
- Meade H.M., Long S.R., Ruvkun G.B., Brown S.E., & Ausubel F.M. (1982)** Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149, 114-122.
- Meinhardt L.W., Ribeiro M.P.M.A., Coletta H.D., Dumenyo C.K., Tsai S.M., & Bellato C.D. (2003)** Genotypic analysis of *Xylella fastidiosa* isolates from different hosts using sequences homologous to the *Xanthomonas rpf* genes. *Mol. Plant Pathol.* 4, 327-335.
- Milewski S., Janiak A., & Wojciechowski M. (2006)** Structural analogues of reactive intermediates as inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase and phosphoglucose isomerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 450, 39-49.
- Miller J.H. (1972)** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miller K.J. & Wood J.M. (1996)** Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 50, 101-136.
- Miller M.B. & Bassler B.L. (2001)** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165-199.
- Mithöfer A., Bhagwat A.A., Keister D.L., & Ebel J. (2001)** *Bradyrhizobium japonicum* mutants defective in cyclic beta-glucan synthesis show enhanced sensitivity to plant defense responses. *Z. Naturforsch. [C].* 56, 581-584.
- Mithöfer A., Lottspeich F., & Ebel J. (1996)** One-step purification of the beta-glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) roots and characterization of an anti-peptide antiserum. *FEBS Lett.* 381, 203-207.
- Mota L.J., Sorg I., & Cornelis G.R. (2005)** Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 1-10.

Mudgett M.B. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56, 509-531.

Mulder L., Hogg B., Bersoult A., & Cullimore J.V. (2005) Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiol. Plant.* 123, 207-218.

Mulligan JT, Long SR. (1985) Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82(19):6609-13.

Niehaus K., Baier R., Becker A., & Pühler A. (1996) Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* defense system -the key of *Rhizobium meliloti* to enter the host plant? En: *Biology of Plant-Microbe Interactions* (Stacey G., Mullin B., & Gresshoff P., eds) ISMPI, St. Paul, pp 349-352.

Niehaus K., Baier R., Kohring B., Flashl E., & Puhler A. (1997) Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. En: *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture*. (Legoki A., Bothe H., & Puhler A., eds) Springer Verlag, Heidelberg (Germany), pp 110-114.

Niehaus K., Kapp D., & Puhler A. (1993) Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta.* 190, 415-425.

Noltmann E.A. (1966) Phosphoglucose isomerase I. Rabbit muscle (crystalline). *Method. Enzymol.* 9, 557-565.

Nour S.M., Cleyetmarel J.C., Normand P., & Fernández M.P. (1995) Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 640-648.

O'Callaghan D., Cazevielle C., Allardet-Servent A., Boschioli M.L., Bourg G., Foulongne V., Frutos P., Kulakov Y., & Ramuz M. (1999) A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol.* 33, 1210-1220.

O'Connell M., Noel T.C., Yeung E.C., Hynes M., & Hynes M.F. (1998) Decreased symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* strains carrying plasmid RP4. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 275-283.

Oldroyd G.E., Engstrom E.M., & Long S.R. (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 13, 1835-1849.

Olivares J., Casadesús J., & Bedmar E.J. (1980) Method for Testing Degree of Infectivity of *Rhizobium meliloti* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 967-970.

Oresnik I.J., Liu S.L., Yost C.K., & Hynes M.F. (2000) Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.* 182, 3582-3586.

Osteras M., Boncompagni E., Vincent N., Poggi M.C., & Le Rudulier D. (1998) Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon:

choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc. Natl Acad Sci U. S. A.* 95, 11394-11399.

Osteras M., Stanley J., & Finan T.M. (1995) Identification of Rhizobium-specific intergenic mosaic elements within an essential two-component regulatory system of Rhizobium species. *J Bacteriol.* 177, 5485-5494.

Parada M, Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, Gutiérrez R, Buendía-Clavería AM, Lei W, Margaret I, López-Baena FJ, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Moreno J, Ruiz-Sainz JE. (2006) *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19; 43-52.

Parniske M., Schmidt P.E., Kosch K., & Muller P. (1994) Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 631-638.

Pauly N., Pucciariello C., Mandon K., Innocenti G., Jamet A., Baudouin E., Herouart D., Frendo P., & Puppo A. (2006) Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume - *Rhizobium* symbiosis. *J. Exp. Bot.* 57, 1769-1776.

Pazour G.J. & Das A. (1990) VirG, An *Agrobacterium tumefaciens* transcriptional activator, initiates translation at a UUG codon and is a sequence-specific DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* 172, 1241-1249.

Pellock B.J., Teplitski M., Boinay R.P., Bauer W.D., & Walker G.C. (2002) A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184, 5067-5076.

Penmetsa R.V. & Cook D.R. (1997) A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science.* 275, 527-530.

Pérez-Mendoza D., Sepulveda E., Pando V., Muñoz S., Nogales J., Olivares J., Soto M.J., Herrera-Cervera J.A., Romero D., Brom S., & Sanjuán J. (2005) Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J. Bacteriol.* 187, 7341-7350.

Perotto S., Brewin N.J., & Kannenberg E.L. (1994) Cytological evidence for a host-defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 99-112.

Perret X., Staehelin C., & Broughton W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 64, 180-201.

Phillips D.A. & Kapulnik Y. (1995) Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol.* 3, 58-64.

Pii Y., Crimi M., Cremonese G., Spena A., & Pandolfini T. (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.* 7, 21.

- Prell J. & Poole P. (2006)** Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14, 161-168.
- Prentki P. & Krisch H.M. (1984)** In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303-13.
- Pueppke S.G. & Broughton W.J. (1999)** *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 293-318.
- Quandt J., Clark R.G., Venter A.P., Clark S.R.D., Twelker S., & Hynes M.F. (2004)** Modified RP4 and Tn5-Mob derivatives for facilitated manipulation of large plasmids in Gram negative bacteria. *Plasmid.* 52, 1-12.
- Quinto C., De L., V, Flores M., Leemans J., Cevallos M.A., Pardo M.A., Azpiroz R., De Lourdes G.M., Calva E., & Palacios R. (1985)** Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1170-1174.
- Raleigh E.A. & Signer E.R. (1982)** Positive selection of nodulation-deficient *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 151, 83-88.
- Rambow-Larsen AA, Rajashekara G, Petersen E, Splitter G. (2008)** Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J. Bacteriol.* 190, 3274-3282
- Ramírez Bahena M.H. (2006)** Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de *Rhizobium* que establecen simbiosis con trébol en España. Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral .
- Ramu S.K., Peng H.M., & Cook D.R. (2002)** Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 522-528.
- Read J., Pearce J., Li X.C., Muirhead H., Chirgwin J., & Davies C. (2001)** The Crystal Structure of Human Phosphoglucose Isomerase at 1.6 angstrom resolution: Implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia. *J. Mol. Biol.* 309, 447-463.
- Reuhs B.L., Williams M.N., Kim J.S., Carlson R.W., & Cote F. (1995)** Suppression of the fix- phenotype of *Rhizobium meliloti* exoB mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J. Bacteriol.* 177, 4289-4296.
- Reynolds E.S. (1963)** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
- Rigaud J. & Puppo A. (1975)** Indole-3 Acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88, 223-228.
- Robertsen B.K., Aman P., Darvill A.G., Mcneil M., & Albersheim P. (1981)** Host-symbiont interactions. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium-Leguminosarum* and *Rhizobium-Trifolii*. *Plant Physiol.* 67, 389-400.

Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Velázquez E, Trujillo ME, Zurdo-Piñeiro JL, Ramírez-Bahena MH, Ramos B, Díaz-Mínguez JM, Dazzo F, Martínez-Molina E, Mateos PF. (2008) *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 13;105(19):7064-9

Rodríguez R.L. & Tait R.C. (1983) Recombinant DNA techniques. An introduction. *The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, California.*

Rosenberg C. & Huguet T. (1984) The pATC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction. *Mol. Gen. Genet.* 196, 533-536.

Rostas K., Kondorosi E., Horvath B., Simoncsits A., & Kondorosi A. (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1757-1761.

Rüberg S., Tian Z.X., Krol E., Linke B., Meyer F., Wang Y., Puhler A., Weidner S., & Becker A. (2003) Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotech.* 106, 255-268.

Rubio M.C., James E.K., Clemente M.R., Bucciarelli B., Fedorova M., Vance C.P., & Becana M. (2004) Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 1294-1305.

Rudnick P.A., Arcondeguy T., Kennedy C.K., & Kahn D. (2001) *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 183, 2682-2685.

Ruíz Argüeso T., Hanus F.J., & Evans H.J. (1978) Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of *R. leguminosarum*. *Arch. Microbiol.* 116, 113-118.

Salzwedel J.L. & Dazzo F.B. (1993) pSym *nod* gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell free supernatants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6, 127-134.

Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santos R., Hérouart D., Puppo A., & Touati D. (2000) Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 38, 750-759.

Santos R., Hérouart D., Sigaud S., Touati D., & Puppo A. (2001) Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 86-89.

Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., & Pühler A. (1994) Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid.* 145, 69-73.

- Scharf B., Schuster-Wolff-Buhring H., Rachel R., & Schmitt R. (2001)** Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: Importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 183, 5334-5342.
- Scheidle H., Gross A., & Niehaus K. (2005)** The lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol.* 165, 559-565.
- Schreyer R. & Bock A. (1980)** Phosphoglucose isomerase from *Escherichia coli* K10: purification, properties and formation under aerobic and anaerobic condition. *Arch. Microbiol.* 127, 289-298.
- Schulein R. & Dehio C. (2002)** The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol. Microbiol.* 46, 1053-1067.
- Segal G. & Shuman H.A. (1998)** Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol.* 30, 197-208.
- Shaw S.L. & Long S.R. (2003)** Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol.* 132, 2196-2204.
- Simon R., Priefer U., & Pühler A. (1983)** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Nat. Biotech.* 1, 784-791.
- Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., & Krol J. (2006)** Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell. Fact.* 5.
- Smit G., Swart S., Lugtenberg B.J.J., & Kijne J.W. (1992)** Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6, 2897-2903.
- Sola-Landa A., Pizarro-Cerda J., Grillo M.J., Moreno E., Moriyon I., Blasco J.M., Gorvel J.P., & Lopez-Goni I. (1998)** A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* 29, 125-138.
- Soto M.J., Fernandez-Pascual M., Sanjuan J., & Olivares J. (2002)** A fadD mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Mol. Microbiol.* 43, 371-82.
- Soto M.J., Sanjuán J., & Olivares J. (2006)** Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology.* 152, 3167-3174.
- Soto M.J., van Dillewijn P., Martínez-Abarca F., Jiménez-zurdo J.I., & Toro N. (2004)** Attachment to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant alfalfa-nodulating bacteria *Rhizobium sp* LPU83. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 71-77.

- Southern E.M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Spaink H.P. (2000)** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 257-288.
- Spaink H.P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Pees E., & Lugtenberg B.J.J. (1987)** Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym Plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9, 27-39.
- Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J.R., & May G.D. (2006a)** Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 9, 110-121.
- Stacey G., McAlvin C.B., Kim S.Y., Olivares J., & Soto M.J. (2006b)** Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 141, 1473-1481.
- Stachel S.E. & Nester E.W. (1986)** The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 5, 1445-1454.
- Staehelin C., Forsberg L.S., D'Haese W., Gao M.Y., Carlson R.W., Xie Z.P., Pellock B.J., Jones K.M., Walker G.C., Streit W.R., & Broughton W.J. (2006)** Exo-oligosaccharides of *Rhizobium* sp. strain NGR234 are required for symbiosis with various legumes. *J. Bacteriol.* 188, 6168-6178.
- Staehelin C., Schultze M., Kondorosi E., & Kondorosi A. (1995)** Lipochitooligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce their rapid degradation by the host plant alfalfa. *Plant Physiol.* 108, 1607-1614.
- Stahl L.E., Jacobs A., & Binns A.N. (1998)** The conjugal intermediate of plasmid RSF1010 inhibits *Agrobacterium tumefaciens* virulence and VirB-dependent export of VirE2. *J. Bacteriol.* 180, 3933-3939.
- Stanley J., Dowling D.N., & Broughton W.J. (1988)** Cloning of *hemA* from *Rhizobium* sp. NGR234 and symbiotic phenotype of a gene-directed mutant in diverse legume genera. *Mol. Gen. Genet.* 215, 32-37.
- Sternberg N.L. & Maurer R. (1991)** Bacteriophage mediated generalized transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Method. Enzymol.* 204, 18-43.
- Stowers M.D. (1985)** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 89-108.
- Suganuma N., Tamaoki M., & Kouchi H. (1995)** Expression of nodulin genes in plant-determined ineffective nodules of pea. *Plant Mol. Biol.* 28, 1027-1038.
- Sun Y.J., Chou C.C., Chen W.S., Wu R.T., Meng M.S., & Hsiao C.D. (1999)** The crystal structure of a multifunctional protein: Phosphoglucose isomerase autocrine motility factor neuroleukin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5412-5417.

- Sutton J.M., Lea E.J.A., & Downie J.A. (1994)** The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9990-9994.
- Taminiau B., Daykin M., Swift S., Boschioli M.L., Tibor A., Lestrade P., De Bolle X., O'Callaghan D., Williams P., & Letesson J.J. (2002)** Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 70, 3004-3011.
- Tang J.L., Liu Y.N., Barber C.E., Dow J.M., Wootton J.C., & Daniels M.J. (1991)** Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 226, 409-417.
- Tellstrom V., Usadel B., Thimm O., Stitt M., Kuster H., & Niehaus K. (2007)** The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 143, 825-837.
- Tilley B.E., Gracy R.W., & Welch S.G. (1974)** A point mutation increasing the stability of human phosphoglucose isomerase. *J Biol Chem.* 249, 4751-4759.
- Tompa P., Szasz C., & Buday L. (2005)** Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci.* 30, 484-489.
- Trainer M.A. & Charles T.C. (2006)** The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 377-386.
- Tsuge S., Ochiai H., Inoue Y., Oku T., Tsuno K., Kaku H., & Kubo Y. (2004)** Involvement of phosphoglucose isomerase in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Phytopathology.* 94, 478-483.
- Tsutsumi S., Gupta S.K., Hogan V., Tanaka N., Nakamura K.T., Nabi I.R., & Raz A. (2003)** The enzymatic activity of phosphoglucose isomerase is not required for its cytokine function. *FEBS Lett.* 534, 49-53.
- Tung S.Y. & Kuo T.H. (1999)** Requirement for phosphoglucose isomerase of *Xanthomonas campestris* in pathogenesis of citrus canker. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5564-5570.
- Udvardi M.K. & Scheible W.R. (2005)** GRAS genes and the symbiotic Green Revolution. *Science.* 308, 1749-1750.
- Van Sluys M.A., Monteiro-Vitorello C.B., Camargo L.E.A., Menck C.F.M., da Silva A.C.R., Ferro J.A., Oliveira M.C., Setubal J.C., Kitajima J.P., & Simpson A.J. (2002)** Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 169-189.
- Vasse J., Debilly F., & Truchet G. (1993)** Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.* 4, 555-566.

- Veereshlingam H., Haynes J.G., Penmetsa R.V., Cook D.R., Sherrier D.J., & Dickstein R. (2004)** *nip*, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response. *Plant Physiol.* 136, 3692-3702.
- Vergunst A.C., van Lier M.C., Dulk-Ras A., Stuve T.A., Ouwehand A., & Hooykaas P.J. (2005)** Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 832-837.
- Viprey V., Del Greco A., Golinowski W., Broughton W.J., & Perret X. (1998)** Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* 28, 1381-1389.
- Viprey V., Perret X., & Broughton W.J. (2000)** Host-plant invasion by rhizobia. *Subcell. Biochem.* 33, 437-456.
- Vlassak K.M., de Wilde P., Snoeck C., Luyten E., van Rhijn P., & Vanderleyden J. (1998)** The *Rhizobium* sp. BR816 *nodD3* gene is regulated by a transcriptional regulator of the AraC/XylS family. *Mol. Gen. Genet.* 258, 558-561.
- Walker S.A. & Downie J.A. (2000)** Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal Nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires *nodO* or *nodE*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 754-762.
- Wallevik K. & Jensenius J.C. (1982)** A simple and reliable method for the drying of polyacrylamide slab gels. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 6, 17-21.
- Wang L.H., He Y., Gao Y., Wu J.E., Dong Y.H., He C., Wang S.X., Weng L.X., Xu J.L., Tay L., Fang R.X., & Zhang L.H. (2004)** A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51, 903-912.
- Winans S.C. (1992)** Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56, 12-31.
- Wisniewski J.P., Rathbun E.A., Knox J.P., & Brewin N.J. (2000)** Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 413-420.
- Yanisch-Perron C., Vieira J., & Messing J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33, 103-119.
- Yao S.Y., Luo L., Har K.J., Becker A., Ruberg S., Yu G.Q., Zhu J.B., & Cheng H.P. (2004)** *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J. Bacteriol.* 186, 6042-6049.
- Young G.M., Schmiel D.H., & Miller V.L. (1999)** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl Acad Sci U. S. A.* 96, 6456-6461.

Yuan Q., Carle A., Gao C., Sivanesan D., Aly K.A., Hoppner C., Krall L., Domke N., & Baron C. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* 280, 26349-26359.

Zhan H.J., Lee C.C., & Leigh J.A. (1991) Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J. Bacteriol.* 173, 7391-7394.

Zheng H.M., Zhong Z.T., Lai X., Chen W.X., Li S.P., & Zhu J. (2006) A LuxR/LuxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. *J. Bacteriol.* 188, 1943-1949.